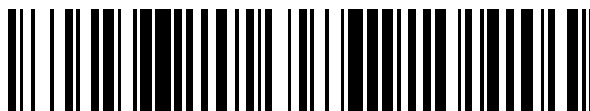


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 398**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2008** **E 08250284 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018** **EP 2065402**

54 Título: **Anticuerpos de estructura trimérica de colágeno**

30 Prioridad:

30.11.2007 US 987498

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.05.2018

73 Titular/es:

**INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH
INSTITUTE (100.0%)
NO. 195, SEC. 4, CHUNG HSING ROAD
HSINCHU CHUTUNG 31040, CN**

72 Inventor/es:

**CHOU, MIN-YUAN;
HUANG, CHUAN-CHUAN;
FAN, CHIA-YU y
LI, HSIU-CHUAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 670 398 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de estructura trimérica de colágeno

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 Los reactivos de unión a base de proteína tienen diversos usos en aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Los anticuerpos han demostrado ser un excelente paradigma para tales reactivos. De hecho, se han usado con éxito varios anticuerpos monoclonales (mAb) para tratar cánceres, enfermedades infecciosas y enfermedades inflamatorias (Adams y col., Nat. Biotechnol. Septiembre de 2005; 23: 1147-57).

Descripción de la técnica relacionada

15 La afinidad del anticuerpo es un factor clave en el éxito de un anticuerpo como agente terapéutico. Un anticuerpo con alta afinidad permite que el anticuerpo compita eficazmente con el ligando natural del receptor objetivo para reducir la dosis, la toxicidad y el costo. Se ha demostrado que la multimerización de los sitios de unión a antígeno es un medio eficaz para aumentar la fuerza total de unión de un anticuerpo con un antígeno que se define como la
20 afección del anticuerpo (afinidad funcional) (Miller y col., J Immunol 170: 4854- 4861, 2003; Rheinacker y col., J Immunol 157: 2989-2997, 1996; Shopes, J Immunol 148: 2918-2922, 1992; Shuford y col., Science 252: 724-727, 1991; Wolff y col., J Immunol 148: 2469-2474, 1992). Los anticuerpos multivalentes tienen una mayor actividad antitumoral *in vivo* (Liu y col., Int Immunopharmacol 6:79 1-799, 2006; Wolff y col., Cancer Res 53: 2560-2565, 1993). Debido a la naturaleza bivalente de la inmunoglobulina G (IgG), la IgG convencional y la modificada no se
25 pueden usar para unirse simultáneamente a más de dos antígenos diferentes. Por lo tanto, existe una necesidad de reactivos de unión basados en proteína multivalente o multispecifica.

En algunos casos, evitar la función efectora, tal como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), mediante modificación de la región Fc es necesaria
30 para reducir los efectos secundarios de la mitogenicidad. Por ejemplo, el mAb CD3 antihumano murino (Ortoclón OKT3, muromonab-CD3), es un potente agente inmunosupresor dirigido al receptor de células T (complejo TCR/CD3 en células T humanas). Se ha utilizado durante las últimas dos décadas para prevenir o tratar el rechazo de aloinjerto (Cosimi y col., N Engl J Med 305: 308-314, 1981; Group, N Engl J. Med 313: 337-342, 1985; Kung y col., Science 206: 347-349, 1979). Sin embargo, un inconveniente principal del uso de esta terapia es la liberación
35 sistémica de citoquinas tales como TNF- α , IL-2 e IFN- γ , que resultan en una serie de efectos mitogénicos adversos, que incluyen síntomas similares a la gripe, dificultad respiratoria, síntomas neurológicos y necrosis tubular aguda (Abramowicz y col., Transplantation 47: 606-608, 1989; Chatenoud y col., N Engl J. Med 320: 1420-1421, 1989; Goldman y col., Transplantation 50: 158-159, 1990; Toussaint y col., Transplantation 48: 524-526, 1989). Dado que la actividad mitogénica de OKT3 y otros mAb anti-CD3 depende de un extenso entrecruzamiento de TCR/CD3 a
40 través de la unión a células positivas para FcR (por ejemplo, monocitos), se han dedicado esfuerzos recientes a desarrollar formas no mitogénicas de anticuerpos anti-CD3 alterando la unión a FcR. Por lo tanto, existe la necesidad de reactivos de unión a base de proteínas que tengan una alta afinidad, un efecto mitogénico bajo y una alta estabilidad *in vivo*.

45 El colágeno es la proteína más abundante en mamíferos. Es una proteína de matriz extracelular que contiene una o más regiones de triple hélice (dominios de colágeno) con una secuencia repetitiva de triplete Gly-XY, donde X y Y son frecuentemente prolina (código del aminoácido, P o Pro) e hidroxiprolina (código del aminoácido, O o Hyp). La presencia de tales tripletes permite que tres cadenas polipeptídicas de colágeno (cadenas α) se plieguen en una conformación de triple hélice. Muchas proteínas de tipo colágeno con dominios de colágeno están presentes en el
50 suero humano y sirven como un sistema inmune innato en la protección de organismos infecciosos. Estos incluyen proteína del complemento C1q, receptores de macrófagos, proteínas de la familia de colectina, lectina que se une a manosa (MBL), ficolinas y proteínas surfactantes A y D (SP-A y SP-D). Una característica estructural común entre estas moléculas de "colágeno de defensa" es que todas ellas están en unidades de proteína multimerica con un dominio de unión al objetivo en el extremo terminal C. En consecuencia, la multimerización aumenta
55 significativamente la afinidad funcional del dominio de unión de estas moléculas de colágeno de defensa.

La trimerización de proteínas de fusión heterólogas que contienen un dominio o dominios de colágeno se ha logrado mediante el empleo de un dominio de trimerización homogéneo o heterólogo fusionado al dominio colagenoso para
60 dirigir la formación del triplex de colágeno. Ejemplos de un dominio de oligomerización del trímero incluyen un propéptido C de procolágenos, un dominio del cuello enrollado en espiral de proteínas de la familia de la colectina, una porción del extremo terminal C de FasL y un dominio foldón de fibrina T4 de bacteriófago (Frank y col., (2001) J Mol Biol 308: 1081-1089; Holler y col., (2003) Mol Cell Biol 23: 1428-1440; Hoppe y col., (1994) FEBS Lett 344: 191-195). El documento WO95/31540 menciona que los polipéptidos que comprenden una región del cuello de colectina son capaces de trimerizarse. Tales polipéptidos pueden comprender aminoácidos adicionales que pueden incluir
65 aminoácidos heterólogos, por ejemplo, que forman un dominio de proteína o derivados de una inmunoglobulina o que comprenden un aminoácido que puede formar un derivado para la unión de una porción no peptídica tal como

oligosacárido, y pueden formar homotrímeros o heterotrímeros. La heterotrimerización puede ser promovida mediante calentamiento suave, por ejemplo, a aproximadamente 50°C, luego enfriar a temperatura ambiente. Un uso para los polipéptidos es en la siembra de formación de colágeno.

El ensamblaje trimérico de colágenos fibrilares (tipos I, II, III, IV, V y XI) y de proteínas de la familia de la colectina se inicia mediante asociación trimérica de sus grandes dominios globulares del extremo terminal C (propéptidos C, ~250 aminoácidos) y dominios de cuello enrollados en espiral del extremo terminal C (~35 aminoácidos), respectivamente, seguido por la propagación del dominio o dominios de colágeno en forma de cremallera desde el extremo terminal C hasta extremo terminal N (Bachinger y col., (1980)) Eur J Biochem 106: 619-632; Hakansson y col., (1999) Structure 7: 255-264; Hakansson y Reid, (2000) Protein Sci 9: 1607-1617; Prockop y Kivirikko, (1995) Annu Rev Biochem 64 : 403-434; Sheriff y col., (1994) Nat Struct Biol 1: 789-794; Weis y Drickamer, (1994) Structure 2: 1227-1240).

La secuencia Gly-Pro-Hyp es la triplete más estable y más común en el colágeno y el péptido (Gly-Pro-Hyp)₁₀ puede por sí mismo asociarse en una estructura de triple hélice altamente estable (Chopra y Ananthanarayanan, (1982) Proc. Natl Acad Sci USA 79: 7180-7184; Engel y col., (1977) Biopolymers 16: 601-622; Sakakibara y col., (1973) Biochim Biophys Acta 303: 198-202, Yang y col., (1997). J Biol Chem 272: 28837-28888). A diferencia del péptido (Gly-Pro-Hyp)₁₀, sintetizado químicamente el péptido (Gly-Pro-Pro)₁₀ no se ensambla por sí mismo en una triple hélice estable bajo condiciones fisiológicas (Engel y col., (1977) Biopolymers 16: 601-622). Para obtener un triplex (Gly-Pro-Pro)₁₀ térmicamente estable, se han descrito dos enfoques. En primer lugar, se obtuvo un triplex unido a (Gly-Pro-Pro)₁₀ unido a disulfuro intracatenario *in vitro* mediante un proceso de redox de un nudo de disulfuro de colágeno tipo III ya sea al extremo terminal C o al extremo terminal N adyacente al péptido de tipo colágeno a 20°C (Boudko y col., (2002) J Mol Biol 317: 459-470; Frank y col., (2003) J Biol Chem 278: 7747-7750). En segundo lugar, se fusionó un dominio foldón trimerizante heterólogo estable derivado de fibrina de bacteriófago T4 al extremo terminal C del péptido (Gly-Pro-Pro)₁₀ para dirigir la trimerización y el plegamiento correcto del péptido de tipo colágeno en un sistema de expresión de *E. coli* deficiente en P4H. (Frank y col., (2001) J Mol Biol 308: 1081-1089). Muchos estudios han examinado las temperaturas de fusión/estabilidad de las repeticiones de G-X-Y. Frank y col., (2001); Persikov y col., (2000) Biochemistry 39, 14960-14967; Persikov y col., (2004) Protein Sci. 13: 893-902; y Mohs y col., (2007) J. Biol. Chem. 282: 29757-29765. Con base en estos estudios, se puede predecir la estabilidad de varias estructuras repetidas.

Los enfoques descritos anteriormente están limitados en su uso debido a que no pueden soportar la trimerización normal y el plegamiento de un polipéptido heterólogo, y pueden introducir un fragmento heteroantigenético asociado con el riesgo de una respuesta inmune que podría limitar severamente aplicaciones terapéuticas potenciales. Por lo tanto, lo que se necesita es un sistema de expresión *in vivo* capaz de formar una estructura triple helicoidal térmicamente estable que impulse la formación de proteínas de fusión triméricas, permitiendo el uso de tales polipéptidos trimerizados, tanto *in vitro* como *in vivo*.

La expresión recombinante de colágenos y péptidos que contienen hidroxiprolina con conformación de triple hélice funcional requiere enzimas postraduccionales específicas, en particular prolil 4-hidroxilasa (P4H) (Prockop y Kivirikko, (1995) Annu Rev Biochem 64: 403- 434). Las prolinas especificadas en la posición Y del motivo Gly-X-Y de colágeno son generalmente modificadas postraduccionalmente a 4-hidroxiprolina por prolil 4-hidroxilasa (P4H) para estabilizar la estructura de triple hélice del colágeno. En ausencia de hidroxilación de prolina, la conformación de triple helicoidal esencial del colágeno es térmicamente inestable a temperaturas fisiológicas inferiores (Berg y Prockop, (1973) Biochem Biophys Res Commun 52: 115-120; Rosenbloom y col., (1973) Arch Biochem Biophys 158: 478-484). Los procariotas no poseen ninguna actividad de P4H. Las levaduras y las células de insectos exhiben una actividad enzimática insuficiente para lograr la expresión de colágeno recombinante a menos que se introduzcan simultáneamente genes P4H exógenos (tanto subunidades α como β) para formar un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ activo.

Los colágenos FACIT no fibrilar (colágeno asociado a fibrillas con triple hélice interrumpida) (tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI y XXII) son un subgrupo dentro de la familia del colágeno. Parecen conectarse con colágenos fibrilares y otros componentes o células de matriz (Shaw y Olsen, (1991) Trends Biochem Sci 16: 191-194). En FACIT, las dos cisteínas conservadas, separadas por cuatro aminoácidos, están ubicadas en la unión de los dominios COL1 y NC1 y son responsables del enlace disulfuro intercatenario entre las tres cadenas de colágeno ensambladas (Mazzorana y col., (2001) J. Biol Chem 276 : 27989-27998).

Los minicolágenos tipo XII y XXI que comprenden los dominios extremos de colágeno (COL1) y no colágeno (NC1) del extremo terminal C, junto con las dos subunidades de los genes P4H humanos se han coexpresado en células de insecto de *Trichoplusia ni* y *Drosophila* S2 infectadas por baculovirus, respectivamente (Mazzorana y col., (2001) J Biol Chem 276: 27989-27998; Li y otros, (2005) Biochem Biophys Res Commun 336: 375-385). La formación de minicolágenos XII y XXI enlazados con disulfuro intercatenario depende del contenido de hidroxiprolina de las cadenas de colágeno, lo que sugiere que el plegamiento de la triple hélice precede a la formación de los enlaces disulfuro. Una hidroxilación de prolilo insuficiente en minicolágeno XXI conduce a la producción de dímeros enlazados por disulfuro intercatenario y monómeros enlazados por disulfuro intracatenarios (Li y col., (2005) Biochim Biophys Res Commun 336: 375-385). Las construcciones que contienen todo el dominio COL1 del colágeno de pollo XII podrían formar trímeros. Mazzorana y col. han demostrado que los constructos que contienen todo el dominio

NC1 del colágeno de pollo XII y las únicas cinco repeticiones de G-X-Y terminales del dominio COL1 no podrían formar trímeros. La presencia de cinco repeticiones de G-X-Y adicionales del extremo terminal C del dominio COL1 permitió la formación de trímeros. Las construcciones utilizadas por Mazzorana contenían un fragmento corto de proteína c-myc humana como etiqueta. Como tal, Mazzorana no abordó el efecto de la trimerización con estas secuencias sobre el plegamiento o la funcionalidad de una molécula unida o el efecto de una molécula unida más grande sobre la autotrimerización.

Sánchez-Arévalo Lobo y col., Int. J. Cancer: 19, 455-462 (2006) describe una terapia antiangiogénica mejorada con las proteínas de fusión del dominio NC1 de anticuerpo-colágeno XVIII modificadas para explotar los eventos de remodelación de la matriz. En este estudio, se generó un agente multiespecífico fusionando el dominio NC1 de colágeno XVIII con un anticuerpo antiangiogénico de cadena única. Se descubrió que esta era procesada eficientemente por proteinasas asociadas a tumores para producir endostatina monomérica y fragmentos de anticuerpos triméricos completamente funcionales.

El documento EP-1798240-A1, una solicitud de patente anterior de los presentes inventores se refiere a un complejo proteico que incluye cadenas polipeptídicas de fusión que forman una espiral de triple hélice, teniendo cada una un dominio de armazón y un dominio heterólogo.

Breve resumen de la invención

Esta invención se refiere a composiciones y métodos que comprenden anticuerpos triméricos. Los anticuerpos pueden tener una alta avidéz, bajos efectos mitogénicos y alta estabilidad *in vivo*. Los anticuerpos pueden ser multivalentes o multiespecíficos.

La invención abarca un anticuerpo soluble trimérico que comprende tres polipéptidos, en el que cada polipéptido comprende: (a) la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG (SEQ ID NO: 13); y (b) un dominio de unión a antígeno; en el que cada polipéptido no contiene ningún otro dominio de trimerización o entrecruzamiento de disulfuro intercatenario dentro o que flanquea la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG.

En ciertas realizaciones, el ligando para el anticuerpo soluble trimérico es el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, el CD3 humano, el HER2/neu humano o el TNF- α humano.

El anticuerpo soluble trimérico puede comprender además una secuencia codificante para un polipéptido marcador. En una realización preferida, el polipéptido marcador es un polipéptido de luciferasa. En otra realización preferida, el polipéptido marcador es un polipéptido fluorescente verde.

En una realización, cada polipéptido no contiene un dominio de colágeno NC1. En una realización, cada polipéptido no contiene un nudo disulfuro. En una realización, cada polipéptido no contiene un dominio foldón de fibrina de bacteriófago T4.

En una realización, cada polipéptido tiene un peso molecular de menos de 42 kD. En una realización, el anticuerpo soluble trimérico tiene un peso molecular de menos de 130 kD.

La invención abarca un ácido nucleico que codifica un anticuerpo soluble trimérico. La invención abarca además un vector de expresión que expresa el anticuerpo soluble trimérico cuando se introduce en una célula huésped. La invención también abarca una célula huésped que comprende un vector de expresión que expresa el anticuerpo soluble trimérico.

La invención abarca un método *in vitro* para generar un anticuerpo soluble trimérico que comprende: (a) unir un ácido nucleico que codifica la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG (SEQ ID NO: 13) en marco con un ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno para un ligando; y (b) expresar el polipéptido codificado en una célula que hidroxiprolina al menos 6 de las repeticiones de G-P-P en el segundo de los dos restos P, donde la célula es una célula eucariota que contiene una actividad enzimática que hidroxila un residuo de prolina; en donde el polipéptido no contiene ningún otro dominio de trimerización o entrecruzamiento de disulfuro intercatenario dentro o que flanquea la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG.

La invención abarca un método *in vitro* para modular (es decir, inhibir o aumentar) la actividad biológica de un ligando que comprende incubar un anticuerpo soluble trimérico que comprende tres polipéptidos con el ligando; en el que cada polipéptido comprende: (a) la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG (SEQ ID NO: 13); y (b) un dominio de unión a antígeno; en donde cada polipéptido no contiene ningún otro dominio de trimerización o entrecruzamiento de disulfuro intercatenario dentro o que flanquea la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG; y en donde la unión del anticuerpo soluble trimérico al ligando modula la actividad biológica del ligando.

La invención abarca un método *in vitro* para detectar un ligando que comprende (1) incubar un anticuerpo soluble trimérico que comprende tres polipéptidos con el ligando; en el que cada polipéptido comprende: (a) la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG (SEQ ID NO: 13); y (b) un dominio de unión a antígeno; en donde cada polipéptido no

contiene ningún otro dominio de trimerización o entrecruzamiento de disulfuro intercatenario dentro o que flanquea la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG; y

(2) detectar la unión del anticuerpo soluble trimérico al ligando.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo soluble trimérico comprende un polipéptido de luciferasa o un polipéptido fluorescente verde.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que muestra un complejo de proteína que tiene un dominio de almacén de colágeno de espiral de triple hélice autoensamblado, tal como el derivado de un minicolágeno humano de tipo XXI o un dominio similar a colágeno de (GPP)₁₀, y un dominio heterólogo.

Las Figuras 2A y 2B son respectivamente (A) una representación esquemática de un anticuerpo de almacén de colágeno trimérico (CSA) que contiene un scFv en el terminal amino derivado de OKT3 (anti-CD3), 528 (anti-EGFR) o erb (anti-EGFR), que se fusionan respectivamente en marco a una región bisagra de IgG humana, un dominio de almacén de colágeno de minicolágeno humano de tipo XXI, seguido de una etiqueta de histidina. Líneas punteadas: enlaces disulfuro intercatenario; y (B) una representación de los resultados de transferencia Western del complejo de proteína. OKT3mC21 contiene un scFv anti-CD3 en el terminal amino derivado de IgG OKT3, una región bisagra de IgG humana, un polipéptido de minicolágeno XXI humano, seguido de una etiqueta de histidina; OKT3mC21fd contiene un scFv anti-CD3 en el terminal amino derivado de IgG OKT3, una región bisagra de IgG humana, un polipéptido de minicolágeno XXI humano, seguido de un dominio foldón de fibrina T4 y una etiqueta de histidina. Los medios de cultivo de las células S2 de *Drosophila* transfectadas de forma estable se sometieron a electroforesis en una SDS-PAGE en condiciones no reductoras y luego se inmunotransfirieron con un anticuerpo monoclonal al extremo terminal C del colágeno de tipo XXI, 3E2. T: trímeros unidos a disulfuro intercatenario; Mt: monómeros que contienen trímeros unidos por puentes disulfuro intracatenarios.

La Figura 3 es un diagrama que muestra un CSA trimérico biespecífico, que contiene un anticuerpo de cadena única OKT3 en el terminal amino (OKT3_scFv), una región bisagra de IgG humana, un dominio de almacén de colágeno del minicolágeno humano de tipo XXI, seguido de un único anticuerpo de cadena sencilla 528 en el extremo terminal C (528_scFv).

Las Figuras 4A (a-e) y 4B (a-c) son representaciones esquemáticas de diferentes formatos de anticuerpos: (A) anticuerpos de almacén de colágeno trimérico: scFv-Col (a), que contiene un scFv en el terminal amino, una región bisagra de IgG humana, un dominio similar a colágeno (GPP)₁₀, y un dominio NC1 en el terminal carboxilo de colágeno tipo XXI; scFv-GPP₁₀ (b), que contiene un scFv en el terminal amino y un dominio de tipo colágeno GSP (GPP)₁₀GPS; Col-scFv (c), que contiene un nudo disulfuro en el terminal amino (TCPPCPRSIP), un dominio similar al colágeno (GPP)₁₀, seguido de un nudo disulfuro en el terminal carboxilo (GICDPSLC) derivado del dominio NC1 del colágeno tipo XXI y un scFv; BiscFv-Col (d), que contiene un scFv 1 en el terminal amino, una región bisagra de IgG humana, un dominio de tipo colágeno (GPP)₁₀, seguido de un nudo de disulfuro en el terminal carboxilo (GICDPSLC) y un scFv 2; scFv-Col-Luc (e), que contiene un scFv en el terminal amino, una región bisagra de IgG humana, un dominio de tipo colágeno (GPP)₁₀, seguido de un nudo de disulfuro en el terminal carboxilo (GICDPSLC) y una luciferasa; (B) de izquierda a derecha: (a) inmunoglobulina G (IgG), (b) anticuerpo quimérico (scFv-Fc) y (c) anticuerpo de cadena sencilla (scFv, área gris). Líneas punteadas: enlaces disulfuro intercatenarios.

Las Figuras 5 A-B representan la purificación y la caracterización estructural de las diversas moléculas de anticuerpo en células de mamífero. (A) Los anticuerpos indicados se expresaron de forma estable en células de mamífero y se purificaron a partir de medios de cultivo mediante cromatografías en columna. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS/Bis-Tris al 10% con regulador MOPS en condiciones no reductoras (carriles 1 a 5) y condiciones reductoras, donde la muestra se trató con 50 mM de DTT durante 10 min a 70°C (carriles 6 a 10). (B) Un hexámero erb_scFv-Col se forma por la unión disulfuro intercatenario de dos moléculas triméricas. Se incubó erb_scFv-Col purificado (1 mg/mL) a 37°C en ausencia (carril 1) o presencia (carriles 3) de DTT 10 mM durante 1 h. Una alícuota de la muestra tratada con DTT se hizo reaccionar con N-etil-maleimida (NEM) 50 mM por 30 minutos a temperatura ambiente (carril 2). Todas las muestras con cantidades iguales de proteína se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS/Tris-acetato al 7% con acetato de sodio como regulador de operación. El gel se tiñó con azul de Coomassie. "M" indica estándares de masa molecular.

Las Figuras 6 A-B representan la estabilidad térmica de la estructura trimérica de erb_scFv-Col. (A) Se trató erb_scFv-Col purificado en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), que contenía urea 2 M, en ausencia (carriles 1 a 3) o presencia (carriles 4 a 9) de TCEP 10 mM a temperatura ambiente. Las muestras reducidas se alquilieron con NEM 50 mM a temperatura ambiente. Todas las muestras, que tenían una cantidad igual de proteína, se calentaron durante 10 min a las temperaturas indicadas y luego se añadió inmediatamente regulador de carga de SDS. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS/Bis-Tris al 10% con regulador MOPS en condiciones no reductoras. El gel se tiñó con azul de Coomassie. (B) Cuantificación de los niveles del trímero erb_scFv-Col reducido/alquilado a diferentes temperaturas de incubación en (a) (de los carriles 4 a 9). Las densidades de las

bandas de proteína se cuantificaron usando un densitómetro. Las cantidades totales de trímero y monómero en cada punto de temperatura se normalizaron a 100.

La Figura 7 representa un perfil de elución de HPLC de derivados de aminoácidos de feniltiocarbamilo (PTC) de erb_scFv-Col después de la hidrólisis ácida. Los aminoácidos que formaron derivados con fenilisotiocianato (PITC) de erb_scFv-Col después de la hidrólisis ácida se separaron en una columna de sílice C18 de fase inversa y los cromóforos PTC se detectaron a 254 nm. La posición máxima del derivado de hidroxiprolina (Hyp) está indicada por una flecha.

Las Figuras 8 A-C representan el análisis de resonancia de plasmón superficial de la interacción entre el dominio extracelular de EGFR y erb_scFv-Col (A); erb_scFv-Fc (B) o erb_scFv (C). Cada anticuerpo se inyectó a las concentraciones indicadas y se hizo fluir sobre un chip de superficie con dominio extracelular del EGFR inmovilizado a un caudal de 10 μ L/min.

La Figura 9 representa un ensayo de desplazamiento de OKT3. Se incubaron células T CD3(+) humanas con diluciones seriadas de OKT3_scFv-Col o IgG OKT3 durante 1 h. Se añadió una cantidad de saturación de OKT3-FITC y se incubó durante una hora adicional. Las células se lavaron y se unieron; OKT3-FITC se cuantificó mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como porcentaje de inhibición de la fluorescencia máxima, tal como se determina añadiendo OKT3-FITC sin anticuerpos de bloqueo previos.

Las Figuras 10 A-B representan la estabilidad de la molécula de CSA. (A) Estabilidad de las diversas formas de anticuerpo erb en suero humano. La estabilidad de erb_scFv-Col, erb_scFv-Fc o erb_scFv se determinó incubando a 37°C en suero humano. La cantidad de anti-EGFR activo que permaneció después de varios períodos de incubación se determinó mediante ELISA usando mAb anti-c-myc. (B) Farmacocinética de erb_scFv-Col en ratones. Se inyectaron ratones C57BL/6 machos por vía intravenosa con 2 mg/kg de erb_scFv-Col. Se tomaron muestras de sangre en diferentes momentos. Los niveles de erb_scFv-Col en plasma se determinaron mediante ELISA usando anticuerpos anti-c-myc de conejo conjugados con HRP. Los resultados se promediaron a partir de 3 animales para cada punto de tiempo y las barras de error representan la desviación estándar.

Las Figuras 11 A-B muestran que la CSA derivado de OKT3 no es mitogénico con actividad inmunosupresora efectiva. (A) Proliferación de células T en respuesta a IgG OKT3 y OKT3_scFv-Col. Se recogieron PBMC humanas de tres donantes normales sanos y se incubaron individualmente con diluciones logarítmicas seriales de IgG OKT3 o OKT3_scFv-Col durante 72 h, se pulsaron con BrdU 10 μ M durante 8 h adicionales. La proliferación celular se midió mediante BrdU-ELISA usando un inmunoensayo quimioluminiscente para cuantificar la incorporación de BrdU durante la síntesis de ADN. Cada punto representa la media $\pm$ S.D. de tres donantes. (B) Inhibición de la reacción de linfocitos mixtos por IgG OKT3 y OKT3_scFv-Col. Las PBMC respondedoras mezcladas con PBMC estimuladoras tratadas con mitomicina C se cocultivaron durante cinco días en presencia de diferentes concentraciones de IgG OKT3 (círculos rellenos) o OKT3_scFv-Col (círculos sin relleno), se pulsaron con BrdU durante 16 h adicionales. La proliferación celular se midió mediante BrdU-ELISA. Las PBMC respondedoras mezcladas con PBMC estimuladoras tratadas con mitomicina C y PBMC respondedoras en ausencia de anticuerpo se mostraron en un cuadrado relleno y un triángulo relleno, respectivamente. La proliferación celular de las PBMC estimuladoras no tratadas en ausencia de anticuerpo se muestra en un cuadrado sin relleno.

Las Figuras 12 A-F representan la liberación de citoquinas inducida por IgG OKT3 y OKT3_scFv-Col. Se recogieron PBMC humanas de tres donantes sanos normales y se incubaron individualmente con diluciones logarítmicas seriales de IgG OKT3 (círculos rellenos) o OKT3_scFv-Col (círculos sin relleno). Los niveles de IL-2 y el resto de las citoquinas indicadas en los sobrenadantes de cultivo se determinaron mediante ELISA en puntos de tiempo de 24 y 72 h, respectivamente. Cada punto representa la media $\pm$ S.D. de tres donantes.

Las Figuras 13 A-B representan la purificación de Col-erb_scFv. (A) Representación esquemática del anticuerpo de armazón de colágeno, Col-erb_scFv, que contiene un nudo de disulfuro en el terminal amino (TCPPCPRSIP), un dominio de tipo colágeno (GPP)₁₀, seguido de un nudo de disulfuro en el terminal carboxilo (GICDPSLC) derivado del dominio NC1 del colágeno tipo XXI y un erb_scFv (anti-EGFR). (B) Purificación de Col-erb_scFv. Se purificó Col-erb_scFv recombinante expresado de forma estable en células NS0 de mieloma de ratón a partir del medio de cultivo mediante cromatografías en columna. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS/Bis-Tris al 10% con regulador MOPS en condiciones no reductoras (carril 1) y condiciones reductoras, donde la muestra se trató con 50 mM de DTT durante 10 min a 70°C (carril 2). El gel se tiñó con solución de tinción de proteína Imperial^{MR} (Pierce Biotechnology, Inc.).

Las Figuras 14 A-C representan el péptido del armazón de colágeno de la CSA, que comprende (GPP)₁₀, por sí mismo puede impulsar la formación de una proteína de fusión trimérica no covalente unida térmicamente estable. (A) Representación esquemática de CSA, erb_scFv-GPP₁₀, que contiene un erb_scFv en el terminal amino (anti-EGFR) y un dominio de tipo colágeno SGP(GPP)₁₀GPS. (B) Estabilidad térmica de la estructura trimérica de erb_scFv-GPP₁₀. Se trató erb_scFv-GPP₁₀ purificado en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), que contenía urea 2 M, en ausencia (carriles 1 a 3) o presencia (carriles 4 a 9) de TCEP 10 mM a temperatura ambiente. Todas las muestras, que tenían una cantidad igual de proteína, se calentaron durante 10 min a las temperaturas indicadas y luego se añadió

inmediatamente regulador de carga de SDS. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS/Bis-Tris al 10% con regulador MOPS en condiciones no reductoras. El gel se tiñó con solución de tinción de proteína Imperial^{MR} (Pierce Biotechnology, Inc.). (C) Unión de erb_scFv-GPP₁₀ a EGFR-ECD mediante ELISA. Una placa de microtitulación de 96 pozos se recubrió con 1 µg/mL de EGFR-ECD y posteriormente se incubó con diversas concentraciones de erb_scFv-GPP₁₀ purificado y anticuerpos anti-c-myc conjugados con HRP. Se midió la absorbancia a 450 nm.

Las Figuras 15 A-C representan la purificación y caracterización de 763_scFv-Col. (A) Representación esquemática de 763_scFv-Col, que contiene un 763_scFv (anti-EGFR) en el extremo terminal amino, una región bisagra mutante de IgG humana, un dominio de tipo colágeno (GPP)₁₀, seguido de un nudo disulfuro (GICDPSLC) de colágeno tipo XXI. (B) El anticuerpo se expresó establemente en células NS0 de mieloma de ratón y se purificó a partir de medios de cultivo mediante cromatografías en columna. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS/Bis-Tris al 10% con regulador MOPS en condiciones no reductoras (carril 1) y condiciones reductoras (carril 2). (C) La inhibición de la fosforilación de tirosina inducida por EGF de EGFR por 763_scFv-Col. Las células A431 se incubaron con o sin EGF 16 nM, en ausencia o presencia de 763_scFv-Col (0,2-150 nM) durante 30 min. Los lisados celulares se separaron en un gel de poliacrilamida SDS/Bis-Tris al 10% con regulador MOPS en condiciones reductoras. Se cargaron cantidades iguales de proteína total de los diferentes lisados celulares en cada carril. La fosforilación de EGFR en lisados celulares se detectó mediante transferencia de Western usando mAb anti-fosfotirosina. Se usó anti-β-actina como control de carga. La fosforilación de tirosina de EGFR inducida por EGF en ausencia de anticuerpos se designó como 100%.

Las Figuras 16 A-C representan la purificación y caracterización de 763_CSA2. (A) Representación esquemática de 763CSA2, que contiene un 763_scFv (anti-EGFR) en el extremo terminal amino, una región bisagra mutante de IgG humana, un dominio similar al colágeno (GPP)₅GKPGKP(GPP)₆, seguido de un nudo disulfuro (GICDPSLC) de colágeno tipo XXI. (B) Identificación de trímeros. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS/Bis-Tris al 10% con regulador MOPS en condiciones no reductoras (carril 2). Carril 1, marcador de peso molecular. (C) Unión de 763CSA2 a EGFR mediante ELISA. Una placa de microtitulación de 96 pozos se recubrió con 1 µg/mL de EGFR y posteriormente se incubó con diversas concentraciones de anticuerpos anti-c-myc conjugados a HRP y 763CSA2 purificados. Se midió la absorbancia a 450 nm.

Las Figuras 17 A-C representan la purificación y caracterización de la CSA biespecífico, 763CSAOKT3. (A) Representación esquemática de 763CSAOKT3, que contiene un 763_scFv (anti-EGFR) en el extremo terminal amino, una región bisagra mutante de IgG humana, un dominio tipo colágeno (GPP)₁₀, seguido de un nudo disulfuro (GICDPSLC) de colágeno tipo XXI y un OKT3_scFv (anti-CD3) en el extremo terminal carboxilo. (B) Análisis de transferencia Western del medio de cultivo que contiene el anticuerpo 763CSAOKT3 biespecífico recombinante. Se separaron alícuotas de 20 µL de medio de cultivo derivado de cuatro clones estables diferentes (numerados del 1 al 4) en un gel de poliacrilamida SDS/Bis-Tris al 10% con regulador MOPS en condiciones no reductoras y reductoras, y luego se inmunotransfirieron con mAb anti-c-myc. Los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpos secundarios antirratón conjugados con peroxidasa. (C) Purificación de 763CSAOKT3. El 763CSAOKT3 recombinante expresado de forma estable en células NS0 de mieloma de ratón se purificó a partir del medio de cultivo mediante cromatografías en columna. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS/Bis-Tris al 10% con regulador MOPS en condiciones no reductoras (carril 1) y condiciones reductoras, donde la muestra se trató con 50 mM de DTT durante 10 min a 70°C (carril 2). El gel se tiñó con solución de tinción de proteína Imperial^{MR} (Pierce Biotechnology, Inc.).

Las Figuras 18 A-C representan el análisis de citometría de flujo de la CSA biespecífico, 763CSAOKT3, entrecruzando células A431 (positivas para EGFR) y células T CD3(+) humanas. Se mezclaron cantidades iguales (1 x 10⁶ células) de células A431 marcadas con PKH-67 y células T CD3(+) marcadas con PKH-26 en ausencia (A) o presencia de 1:4 (B); dilución 1:2 (C) de un medio de cultivo que contiene anticuerpo 763CSAOKT3 biespecífico recombinante.

La Figura 19 A-B representa la purificación y caracterización de la CSA bifuncional, h4D5CSA-Luc. (A) Representación esquemática de h4D5CSA-Luc, que contiene un h4D5_scFv en el extremo terminal amino (anti-HER2/neu), una región bisagra mutante de IgG humana, un dominio tipo colágeno (GPP)₁₀, seguido de un nudo disulfuro (GICDPSLC) de colágeno tipo XXI y una luciferasa de *Gaussia* en el extremo terminal carboxilo. (B) Purificación de h4D5CSA-Luc. h4D5CSA-Luc recombinante expresado de forma estable en células NS0 de mieloma de ratón se purificó a partir del medio de cultivo mediante cromatografías en columna. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS/Bis-Tris al 10% con regulador MOPS en condiciones no reductoras (carril 2) y condiciones reductoras, donde la muestra se trató con 50 mM de DTT durante 10 min a 70°C (carril 3). El gel se tiñó con solución de tinción de proteína Imperial^{MR} (Pierce Biotechnology, Inc.). Carril 1, marcador de peso molecular. (C) Unión de h4D5CSA-Luc a células SKOV-3 que sobreexpresaron HER2/neu mediante ELISA. Se recubrió una microplaca de 96 pozos con 5 x 10⁴ células/pozo y se incubó con una dilución doble en serie de h4D5CSA-Luc purificada. Después de lavar la placa con PBS/BSA al 1%, los anticuerpos unidos se detectaron mediante la adición de coelenterazina y los valores de bioluminiscencia se adquirieron usando un microplaca-luminómetro. Las muestras se analizaron por triplicado.

Las Figuras 20 A-B representan la purificación y caracterización de 357_scFv-Col. (A) El anticuerpo se expresó establemente en células NS0 de mieloma de ratón y se purificó a partir de medios de cultivo mediante cromatografías en columna. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS/Bis-Tris al 10% con regulador MOPS en condiciones no reductoras (carril 1) y condiciones reductoras (carril 2). (B) Neutralización de la apoptosis inducida por TNF- α de células L929 por 357_scFv-Col y 357 IgG. Se incubaron células de fibroblastos de ratón L929 (5×10^3 células) con diferente concentración de 357_scFv-Col o 357 IgG, que contenía 2 $\mu\text{g/mL}$ de actinomicina D y 10 ng/mL de TNF- α recombinante humano durante 24 h. La citotoxicidad celular inducida por TNF- α se determinó mediante ensayo de MTT. El número de células viables se determinó midiendo las densidades ópticas a 460 nm. La neutralización de TNF- α por anticuerpo se calculó usando la fórmula de % de Neutralización = $100 \times (\text{Citotoxicidad}_{\text{control}} - \text{Citotoxicidad}_{\text{Ab}}) / \text{Citotoxicidad}_{\text{control}}$; % de citotoxicidad = $100 \times (A_{\text{control}} - A_{\text{prueba}}) / A_{\text{control}}$, donde A_{control} era la absorbancia en los pozos de control (sin TNF- α) y A_{prueba} era la absorbancia en pozos con TNF- α (Citotoxicidad_{control}) o TNF- α más anticuerpo (Citotoxicidad_{Ab}).

Descripción detallada del invento

La presente invención se basa, en parte, en los descubrimientos de que un dominio de anticuerpo fusionado en marco a un dominio de armazón de colágeno permite que la trimerización del dominio de armazón genere un anticuerpo trimérico y la avidez de unión del anticuerpo trimérico resultante se mejora en comparación con la IgG divalente y los formatos de scFv monovalentes. Los anticuerpos triméricos fabricados de acuerdo con la invención pueden tener afinidades funcionales (avidez) por sus ligandos de más de 10^9 M^{-1} .

En la presente invención, un dominio de armazón de colágeno se fusiona en el marco con un dominio de anticuerpo para generar un anticuerpo soluble trimérico. Un anticuerpo soluble es uno que es soluble en condiciones fisiológicas. En una realización preferida, el anticuerpo trimérico soluble es un anticuerpo secretado. Un anticuerpo secretado es aquel que es secretado por una célula. La secreción de un anticuerpo se puede dirigir teniendo una secuencia señal en el polipéptido que comprende el dominio del anticuerpo.

En una realización, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando de más de 10^7 M^{-1} . En una realización, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando de más de 10^8 M^{-1} . En una realización, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando de más de 10^9 M^{-1} . En ciertas realizaciones, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando entre 10^7 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} , entre 10^7 M^{-1} y 10^9 M^{-1} , entre 10^7 M^{-1} y 10^8 M^{-1} , entre 10^8 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} , entre 10^8 M^{-1} y 10^9 M^{-1} , y entre 10^9 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} .

En una realización, se usa el péptido corto tipo colágeno térmicamente estable (Gly-Pro-Pro)₁₀ como un dominio de armazón para dirigir la trimerización de un dominio de anticuerpo expresando la construcción de fusión en un sistema con suficiente actividad de P4H. Este enfoque facilita la adopción de la estructura estable de triple hélice, que afecta la valencia de la proteína, la estabilidad y la función *in vivo*.

La presente invención abarca el uso de la secuencia de tipo colágeno (Gly-Pro-Pro)₁₀ como un dominio de armazón de colágeno capaz de autonucleación y propagación de las proteínas de fusión heterólogas desde la dirección del extremo terminal C o N. La presente invención evita la necesidad de cualquier otro dominio de estructura de trimerización.

Las proteínas de fusión del dominio de armazón de colágeno pueden formar una estructura de triple hélice térmicamente estable mediante la expresión de la construcción de fusión en un sistema que contiene prolil 4-hidroxilasa. Además, el armazón de colágeno de autotrimerización de la invención permite la unión de los compañeros de fusión a cualquiera de los extremos terminales, así como a ambos extremos terminales, simultáneamente. Esto tiene importantes consecuencias ya que el armazón de colágeno de autotrimerización puede emplearse para construir moléculas que pueden interactuar (cada extremo con una valencia de unión de hasta 3 o 6) simultáneamente con dos compañeros de unión voluminosos. La presente invención también demuestra que los anticuerpos triméricos pueden plegarse correctamente y exhibir alta solubilidad, avidez y estabilidad.

Como se usa en el presente documento, el término "dominio de armazón de colágeno" es un dominio colagenoso o de tipo colágeno que permite la formación de una estructura triplex por sí misma, en donde una "estructura triplex" es un complejo de tres subunidades unido covalentemente o no covalentemente. Como se usa en el presente documento, el término "dominio de armazón de colágeno" se refiere a los dominios colagenosos o de tipo colágeno que dirigen la autotrimerización del dominio de armazón.

Como se usa en el presente documento, el término "dominio de armazón de colágeno" no se refiere a propéptidos C de procolágenos, dominios de cuello enrollado en espiral de proteínas de la familia colectina o ficolina, el dominio similar a lectina de tipo C de tetranectina, dominio de trimerización de beta-galactosidasa, la estructura de triple hélice enrollada en espiral del mutante de cremallera de leucina GCN4 (Harbury y col., (1993) Science 262: 1401-1407), dominios C1q y TNF de proteínas de la superfamilia C1q y TNF y dominios foldón de fibrina de bacteriófago T4.

Un "anticuerpo de armazón de colágeno" o "CSA" es un anticuerpo que incluye un dominio de armazón de colágeno fusionado a un dominio de anticuerpo. Un CSA y su secuencia de codificación pueden comprender cualquier combinación de las SEQ ID siguientes. Cada una de estas combinaciones se describe específicamente en este documento. Por ejemplo, la CSA puede contener una o más de las SEQ ID NOs 1, 3, 5 y 9.

Por consiguiente, un aspecto de esta invención presenta un complejo de proteína recombinante aislado que incluye una primera cadena polipeptídica de fusión que contiene un primer dominio de armazón de colágeno y un primer dominio de anticuerpo fusionado en marco con un extremo del primer dominio de armazón de colágeno; una segunda cadena polipeptídica de fusión que contiene un segundo dominio de armazón de colágeno; y una tercera cadena polipeptídica de fusión que contiene un tercer dominio de armazón de colágeno. Los dominios del armazón de colágeno primero, segundo y tercero están alineados para formar una bobina de triple hélice. El primer dominio de armazón de colágeno y el primer dominio de anticuerpo se fusionan en el marco y en la misma cadena de péptido.

La cadena polipeptídica de fusión puede incluir la secuencia de un dominio enzimático o una proteína fluorescente. Los ejemplos de una proteína fluorescente incluyen GFP y dsRed, así como sus variantes. Los ejemplos de un dominio enzimático incluyen el de glutatión S-transferasa, luciferasa, β -galactosidasa y β -lactamasa.

La cadena polipeptídica de fusión puede incluir, o excluir, la secuencia de etiquetas de afinidad con el fin de detectar y purificar las proteínas de fusión de la invención. Los ejemplos de etiquetas de afinidad incluyen etiqueta polihistidina, etiqueta myc, etiqueta Strep, FLAG, etiqueta E, etiqueta de hemaglutinina, T7, etiqueta S, HSV, VSV-G, anti-Xpress y etiqueta VS.

El "dominio de anticuerpo" incluye una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina. De acuerdo con la presente invención, el dominio de anticuerpo incluye partes de unión a antígeno de un anticuerpo, tales como un dominio V_H y uno Fab. En una realización, el primer dominio de anticuerpo contiene la secuencia de un fragmento de unión a antígeno o un anticuerpo de cadena sencilla, por ejemplo, el específico para agrupaciones de diferenciación 3 (CD3), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), HER2/neu o el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α). La primera cadena polipeptídica puede contener además un segundo dominio de anticuerpo fusionado en marco al otro extremo del primer dominio de armazón.

En la presente invención, una segunda cadena polipeptídica de fusión contiene un segundo dominio de anticuerpo. En una realización preferida, los dominios de anticuerpo primero y segundo son idénticos entre sí. Los dominios de unión de anticuerpo primero y segundo se pueden unir a un compañero de unión idéntico o a dos compañeros de unión diferentes. Por ejemplo, el primer dominio de anticuerpo y el segundo dominio de anticuerpo pueden contener las secuencias de un primer anticuerpo de cadena sencilla y un segundo anticuerpo de cadena sencilla que se unen específicamente a CD3 y EGFR, respectivamente. En una realización, el primer y el segundo polipéptido de fusión contienen el primero y segundo dominios de unión de anticuerpo.

La segunda cadena polipeptídica de fusión puede contener un tercer dominio de anticuerpo fusionado en marco a un extremo del segundo dominio de armazón, un cuarto dominio de anticuerpo fusionado en marco al otro extremo del segundo dominio de armazón, o ambos dominios fusionados en marco a los dos extremos. De manera similar, la tercera cadena polipeptídica de fusión puede contener un quinto dominio de anticuerpo fusionado en marco a un extremo del tercer dominio de armazón, o un sexto dominio de anticuerpo fusionado en marco al otro extremo del tercer dominio de armazón, o a ambos. Los seis dominios de anticuerpos pueden ser idénticos o diferentes entre sí. Por lo tanto, pueden unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 compañeros de unión. En otras palabras, el complejo de proteína puede ser mono, di, tri, tetra, penta o hexavalente.

Para que el primer, segundo y tercer dominio de armazón formen una bobina de triple hélice, cada uno de los tres dominios de armazón contiene una o más repeticiones de triple hélice, conocidos como dominios de colágeno o similares a colágeno, cada repetición contiene una secuencia del siguiente fórmula: $(G-X-Y)_n$, en la que G es un residuo de Gly; X y Y son cualquier residuo de aminoácido, y preferiblemente, el aminoácido prolina o hidroxiprolina; y n es 5 o mayor. Como se hace referencia en este documento, una "repetición" se refiere a dos o más secuencias G-X-Y secuenciales.

Como se describe en este documento, el dominio de armazón puede incluir un triplete GXY repetitivo perfecto, interrumpido por una imperfección corta, en la que falta la primera posición de Gly o la tercera posición del residuo Y, que se encuentra en muchos colágenos y proteínas de origen natural que contienen dominios similares al colágeno. Por ejemplo, el dominio de armazón descrito en este documento, minicolágeno humano de tipo XXI, contiene dos imperfecciones, GF y KE, dentro del dominio de colágeno.

Se describe en la presente memoria un dominio de armazón de colágeno que comprende al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, o al menos 20 repeticiones de G-X-Y; en donde G es glicina, X es cualquier aminoácido y Y es cualquier aminoácido. Como se describe en este documento, al menos 10 de las repeticiones de G-X-Y pueden ser G-P-P o G-P-O. Como se describe en este documento, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 de las

repeticiones de G-X-Y pueden ser G-P-O, en donde P es prolina y O es hidroxiprolina. El dominio del armazón de colágeno dirige la autotrimerización.

En el presente documento se describen dominios de armazón de colágeno que comprenden la secuencia (G-P-P/O)₁₀. En este documento, se describen dominios de armazón de colágeno que comprenden menos de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 27, 30, 35, 40, 45 o 50 repeticiones de G-X-Y. En la presente memoria se describen dominios de armazón de colágeno de menos de 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50 o 40 aminoácidos de longitud. También se describen en el presente documento dominios de armazón de colágeno que consisten esencialmente en 10-30 repeticiones de G-X-Y, que provocan autotrimerización.

Más de 1/3 de las repeticiones de G-X-Y pueden ser G-P-P o G-P-O. Más de 1/2 de las repeticiones de G-X-Y pueden ser G-P-P o G-P-O. Más de 2/3 de las repeticiones de G-X-Y pueden ser G-P-P o G-P-O. Más de 3/4 de las repeticiones de G-X-Y pueden ser G-P-P o G-P-O. Todas las repeticiones de G-X-Y pueden ser G-P-P o G-P-O. En la presente memoria se describe un dominio de armazón que comprende la secuencia (G-P-P/O)₅GKPGKP(G-P-P/O)₆. En la presente memoria se describe un dominio de armazón que comprende la secuencia (G-P-P/O)₁₀, donde P/O indica P u O.

Se describe en la presente memoria un dominio de armazón de colágeno que comprende al menos 10 repeticiones de G-X-Y, donde al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 de los residuos de Y son hidroxiprolina. El dominio del armazón de colágeno dirige la autotrimerización.

Se describe en el presente documento un dominio de armazón de colágeno que comprende al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 repeticiones de G-P-O y un dominio de anticuerpo; en donde los dominios de armazón de colágeno de los tres polipéptidos interactúan entre sí para formar un anticuerpo soluble trimérico que se une específicamente a un ligando con una afección de al menos 10^7 M^{-1} . El dominio del armazón de colágeno puede comprender 6 o 7 repeticiones de G-P-O. Las repeticiones de G-P-O pueden ser secuenciales o pueden estar separadas. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, las repeticiones de G-P-P pueden espaciarse como dos secuencias de aminoácidos en marco que comprenden 3, 4 o 5 repeticiones de G-P-O separadas por 1, 2, 3, 4 o 5 repeticiones de G-X-Y. En el presente documento se describe un dominio de armazón de colágeno que comprende (G-P-O)₃GXY(GPO)₄.

Se describe en el presente documento un dominio de armazón de colágeno que es el dominio de colágeno (COL1) de un colágeno FACIT no fibrilar (colágeno asociado a fibrillas con triple hélice interrumpida). Preferiblemente, un anticuerpo trimérico que comprende el dominio COL1 de un FACIT no fibrilar no contiene el dominio no colagenoso (NC1) del FACIT. También se describe en el presente documento un dominio COL1 de colágenos de tipo IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI o XXII. En el presente documento se describe un anticuerpo trimérico que comprende la SEQ ID NO: 7.

Se describe en el presente documento un dominio de armazón de colágeno que tiene al menos un 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con un dominio COL1 completo de colágeno de los tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI o XXII. También se describe en el presente documento un dominio de armazón de colágeno que tiene al menos un 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con las repeticiones de G-X-Y de un dominio COL1 de colágeno de los tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI o XXII.

Se describe en el presente documento un dominio de armazón de colágeno que tiene al menos un 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 30 repeticiones de G-X-Y de un dominio COL1 de colágeno de los tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI o XXII. También se describe en el presente documento un dominio de armazón de colágeno que tiene una identidad de al menos el 75%, 80%, 85%, 90% o 95% con 10 repeticiones de G-X-Y de un dominio COL1 del colágeno de tipo XXII.

La secuencia G-X-Y del dominio del armazón de colágeno puede comprender al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 hidroxiprolinas en la posición Y.

El porcentaje de identidad puede determinarse, por ejemplo, comparando información de secuencia usando el programa informático GAP, versión 6.0 descrito por Devereux y col. (Nucl. Acids Res. 12: 387, 1984) y disponible a través del Genetics Computer Group de la Universidad de Wisconsin (UWCG). El programa GAP utiliza el método de alineación de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443, 1970), revisado por Smith y Waterman (Adv. Appl. Math 2: 482, 1981). Los parámetros predeterminados preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para las identidades y de 0 para las no identidades) para los nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de Gribkov y Burgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986, como lo describen Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, páginas 353-358, 1979; (2) una penalización de 3,0 por cada espacio y una penalización adicional de 0,10 por cada símbolo en cada espacio; y (3) no hay penalización para los espacios finales.

En una realización, el primero, segundo y tercer polipéptidos de fusión descritos anteriormente son sustancialmente idénticos, teniendo al menos el 75% (por ejemplo, cualquier número entre el 75% y el 100%, inclusive) de identidad

de secuencia entre sí. Un complejo formado por tres polipéptidos de fusión idénticos es un homotrímero. Los tres polipéptidos de fusión pueden ser equivalentes funcionales. Un "equivalente funcional" se refiere a un derivado polipeptídico de un polipéptido común, por ejemplo, una proteína que tiene una o más mutaciones puntuales, inserciones, supresiones, truncamientos, una proteína de fusión, o una combinación de los mismos, y que conserva sustancialmente la capacidad de formar una triple hélice helicoidal y la actividad del dominio heterólogo, tal como la unión a un ligando.

Un polipéptido, ácido nucleico o gen heterólogo es un polipéptido, ácido nucleico o gen que está asociado con otro polipéptido, ácido nucleico o gen con el que no está asociado de forma natural. Dos dominios o secuencias fusionados son heterólogos entre sí si no están adyacentes entre sí en una proteína o ácido nucleico natural.

También se describe en el presente documento un polipéptido de fusión recombinante aislado (por ejemplo, cada uno de los tres polipéptidos de fusión mencionados anteriormente) que contiene (i) un dominio de armazón de colágeno para formar una espiral de triple hélice y (ii) un primer dominio heterólogo fusionado en marco a un extremo del dominio de armazón o un segundo dominio heterólogo fusionado en marco al otro extremo del dominio de armazón. El dominio heterólogo puede incluir uno de los dominios de anticuerpo mencionados anteriormente, y se puede obtener mediante diversos métodos reconocidos en la técnica, tales como el cribado de presentación en fago.

Un polipéptido o complejo proteico "aislado" se refiere a un polipéptido o un complejo de proteína sustancialmente libre de moléculas asociadas naturalmente, es decir, es al menos 75% (es decir, cualquier número entre 75% y 100%, inclusive) puro por peso en seco. La pureza se puede medir mediante cualquier método estándar apropiado, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliácridamida o análisis por HPLC. Un polipéptido o complejo de proteína aislado de la invención se puede purificar a partir de una fuente natural, producida mediante técnicas de ADN recombinante.

Preferiblemente, los tres polipéptidos que se trimerizan para formar un anticuerpo trimérico no son contiguos. En otra realización, los tres polipéptidos que se trimerizan para formar un anticuerpo trimérico son contiguos, es decir, traducidos como un único producto de traducción. En esta realización, los tres polipéptidos se pueden unir mediante dos o más regiones bisagras flexibles.

La invención también abarca un ácido nucleico aislado que contiene una secuencia que codifica el polipéptido de fusión recién mencionado o un complemento de la secuencia. Un ácido nucleico se refiere a una molécula de ADN (por ejemplo, un ADNc o ADN genómico), una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm) o un análogo de ADN o ARN. Un análogo de ADN o ARN puede sintetizarse a partir de análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble. Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a la de cualquier ácido nucleico de origen natural o a la de cualquier fragmento de un ácido nucleico genómico de origen natural. Por lo tanto, el término cubre, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de una parte de una molécula de ADN genómico natural pero no está flanqueado por las dos secuencias codificantes que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en que ocurre naturalmente; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procarionte o eucarionte de una manera tal que la molécula resultante no sea idéntica a cualquier vector natural o ADN genómico; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión. El ácido nucleico descrito anteriormente se puede usar para expresar el polipéptido de esta invención. Para este fin, se puede unir operativamente el ácido nucleico a secuencias reguladoras adecuadas para generar un vector de expresión.

Un vector se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. El vector puede ser capaz de replicación autónoma o integrarse en un ADN huésped. Los ejemplos de un vector incluyen un plásmido, cósmido o vector viral. El vector de esta invención incluye un ácido nucleico en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. Preferiblemente, el vector incluye una o más secuencias reguladoras operativamente unidas a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Una "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos, así como secuencias reguladoras y/o inducibles específicas de tejido. El diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada y similares. El vector de expresión se puede introducir en células huésped para producir el polipéptido de esta invención. También dentro del alcance de esta invención se encuentra una célula huésped que contiene el ácido nucleico descrito anteriormente. Los ejemplos incluyen células de *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, que usan células S2 de *Drosophila* o células de insecto infectadas con baculovirus), células de levadura o células de mamífero (por ejemplo, células NS0 de mieloma de ratón). Véase, por ejemplo, Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA.

Para producir un polipéptido de fusión descrito en este documento, se puede cultivar una célula huésped en un medio en condiciones que permitan la expresión del polipéptido codificado por un ácido nucleico de esta invención, y

purificar el polipéptido de la célula cultivada o el medio de la célula. Alternativamente, el ácido nucleico de esta invención puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo, usando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

Para producir un complejo de proteína de esta invención, se puede cultivar una célula huésped que contiene un primer, segundo y tercer ácidos nucleicos que codifican al primer, segundo y tercer polipéptidos de fusión en un medio bajo una condición que permite la expresión de polipéptidos codificados por los tres ácidos nucleicos y formación de una espiral de triple hélice entre los polipéptidos expresados, y purificación del complejo de proteína de la célula cultivada o el medio de la célula. La célula huésped es una célula eucariótica que contiene una actividad enzimática que hidroxila un residuo de prolina.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en el dibujo adjunto y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y el dibujo, y de las reivindicaciones.

Un anticuerpo trimérico soluble de esta invención tiene ventajas sobre los anticuerpos convencionales. Por un lado, cuando dos o más de los seis dominios de anticuerpo son idénticos entre sí, el complejo de proteína puede tener 2-6 dominios de anticuerpo que son específicos para un compañero de unión (por ejemplo, antígeno) en comparación con un anticuerpo convencional, que tiene solo dos de esos dominios. En otras palabras, a diferencia de un anticuerpo convencional, que es solo divalente para un antígeno, el complejo de proteína puede ser di, tri, tetra, penta o hexavalente. Como resultado, se puede hacer que tenga afinidades que sean más altas que un anticuerpo convencional. Debido a las afinidades más altas, se necesitan cantidades más pequeñas del complejo de proteína y una duración de incubación más corta que un anticuerpo convencional para alcanzar los objetivos deseados, por ejemplo, efectos terapéuticos, reduciendo así los costes de tratamiento y minimizando los efectos secundarios (por ejemplo, respuestas inmunes no deseadas).

Por otro lado, cuando dos o más de los seis dominios son diferentes entre sí, un complejo de proteína de esta invención puede tener 2-6 dominios de anticuerpo que son específicos para 2-6 compañeros de unión diferentes. Unificando múltiples sitios asociados de unión de diferentes especificidades en una unidad, se tiene la capacidad de reunir múltiples compañeros de unión y, por lo tanto, tiene usos deseables en terapia, reconstrucción de tejidos y ensamblaje de maquinaria proteínica activa (por ejemplo, una enzima de subunidades múltiples) a nivel de nanómetros.

Para uso *in vivo* en un ser humano, un anticuerpo trimérico de esta invención es preferiblemente de origen humano. Por ejemplo, puede incluir una secuencia de anticuerpo de cadena sencilla humanizada fusionada en marco con un dominio de armazón de colágeno de origen humano. Dado que muchas proteínas de tipo colágeno con dominios de colágeno son bastante estables en la sangre, las proteínas de fusión del dominio de armazón también deben conservar la integridad estructural en la sangre.

La secuencia Gly-Pro-Hyp contribuye más a la formación y estabilización de una estructura de triple hélice y las repeticiones del tripéptido Gly-Pro-Hyp se autoensamblan en una triple hélice altamente estable. Por lo tanto, el dominio colagenoso de minicolágeno XXI se sustituyó con un péptido corto similar al colágeno térmicamente estable (Gly-Pro-Pro)₁₀ como una plantilla de armazón para las CSA descritas en el presente documento, que se expresaron en un sistema de mamífero con suficiente actividad de P4H para facilitar la adopción de la estructura estable de triple hélice. De hecho, tanto erb_scFv-Col como OKT3_scFv-Col se ensamblaron en una estructura trimérica y erb_scFv-Col se puede oligomerizar adicionalmente en un hexámero, presumiblemente a través del entrecruzamiento de disulfuro intercatenario entre los dos residuos de cisteína del extremo terminal C dentro de los dos trímeros. La oligomerización de erb_scFv-Col del trímero al hexámero es un proceso intracelular porque la estructura trimérica reducida no se ensambla en estructuras de orden superior en concentraciones superiores a las que normalmente se encuentran en la forma hexamérica de erb_scFv-Col.

Las células NS0 de mieloma de ratón son un buen sistema de expresión para la producción de proteína de colágeno recombinante o de tipo colágeno. Aproximadamente el 61% del número total de residuos de prolina en la posición Y de una secuencia del triplete GXY colagenoso de (Gly-Pro-Pro)₁₀ se hidroxila en erb_scFv-Col recombinante. Por lo tanto, al menos 6 de las repeticiones de Gly-Pro-Pro se hidroxilaron en este sistema. La contribución del motivo (Gly-Pro-Pro)₁₀ prolil hidroxilado al montaje trimérico de las moléculas de CSA fue prominente, ya que casi no había forma monomérica de la CSA presente en el medio de cultivo, como se examinó mediante análisis de transferencia Western. La presencia de urea 2 M en la muestra de CSA purificada a una temperatura de hasta 45°C, después de agregar regulador de carga de SDS al 2%, no fue lo suficientemente fuerte como para disociar la forma trimérica de la CSA, como se juzga a partir del nivel de monómeros fundidos mostrados en la Fig. 6B y la Fig. 14B. En los ensayos de estabilidad en suero, en los que varios formatos de anticuerpos erb se incubaron en suero humano a 37°C durante hasta 7 días, la concentración de anticuerpo utilizada en ELISA para erb_scFv-Col estaba en el intervalo nanomolar, en lugar de en los intervalos submicromolares y micromolares como para las contrapartes erb_scFv-Fv bivalente y erb_scFv monovalente, respectivamente. Por lo tanto, una CSA puede retener su formato de unión a objetivos multivalente en condiciones fisiológicas.

La estructura trimérica térmicamente estable de CSA cumple el requisito de un sistema de multimerización multipropósito para uso futuro *in vivo*. Muchas proteínas de tipo colágeno con dominios colagenosos están presentes en el suero humano y sirven como un sistema inmune innato en la protección de organismos infecciosos. Estos incluyen proteína del complemento C1q, proteínas de la familia de la colectina, lectina de unión a manosa (MBL), ficolinas y proteínas surfactantes A y D (SP-A y SP-D). Una característica estructural común entre estas moléculas de "colágeno de defensa" es que todas ellas están en unidades de proteína multimerica con un dominio de unión al objetivo en el extremo terminal C. La fuerza impulsora para la formación de estas estructuras multimericas es similar a la de los colágenos fibrilares. Las tres cadenas polipeptídicas se trimerizaron primero usando su dominio de cuello enrollado en espiral, que está en el extremo terminal N junto al dominio de unión al objetivo, luego el plegamiento de triple hélice del dominio tipo colágeno procedió de manera similar a una cremallera desde el extremo terminal C hasta el N, antes de finalmente apilarse o entrelazar disulfuro intracatenario de las moléculas triméricas usando sus residuos de cisteína del extremo terminal N (Hakansson y col., (1999) Structure 7: 255-264; Hakansson y Reid, (2000) Protein Sci 9: 1607- 1617; Sheriff y col., (1994) Nat Struct Biol 1: 789-794; Weis y Drickamer, (1994) Structure 2: 1227-1240). En consecuencia, la multimerización aumenta significativamente la afinidad funcional del dominio de unión de estas moléculas de colágeno de defensa.

El impacto de la avidéz de unión al objetivo fue evidente cuando se compararon las diversas especies de anticuerpos erb y OKT3 usando resonancia de plasmón superficial (SPR) y análisis de citometría de flujo de competición. Los datos de unión demostraron que el aumento de la valencia en la molécula de CSA puede mejorar el grado y la especificidad del direccionamiento *in vivo*, lo que conduce a una retención objetivo mejorada. La dosificación efectiva de CSA OKT3 trivalente para la inmunosupresión de la activación de células T es menor que la de la IgG OKT3 original probada en una reacción mixta de linfocitos.

OKT3_scFv-Col no induce la proliferación de células T ni la producción de IL-2 en PBMC humanas, reduciendo en gran medida los efectos del síndrome de primera dosis de OKT3 que es causado por la liberación de citoquinas como resultado de la activación transitoria de células T. Este nuevo formato anti-CD3 puede proporcionar un potente fármaco inmunosupresor con dosis, toxicidad y costo de la terapia reducidos. La humanización de mAb murino mediante injerto de CDR con o sin diseño basado en la estructura para transformar un residuo o residuos de CDR de origen murino a humano a menudo da como resultado una reducción o pérdida de afinidad de unión (Queen y col., (1989) Proc Natl Acad Sci. USA 86: 10029-10033; Riechmann y col., (1988) Nature 332: 323-327). En una realización preferida, el anticuerpo soluble trimérico no contiene un dominio Fc.

La maduración de la afinidad por redistribución de cadenas usando la selección de bibliotecas de scFv de presentación en fago para los enlazadores de alta afinidad es un proceso tedioso; sin embargo, el resultado de mejorar la afinidad de unión es incierto. Por lo tanto, muchos anticuerpos terapéuticos pueden verse obstaculizados por la baja afinidad por el antígeno objetivo después de la humanización. En algunos casos, las propiedades del anticuerpo deben ser refinadas aún más. La polimerización de los compañeros de unión al antígeno aumenta enormemente su disponibilidad para unirse a un grupo de ligandos idénticos específicos muy cerca de una célula objetivo. Se han propuesto diferentes enfoques para obtener moléculas multivalentes para mejorar la afinidad funcional. Algunos implican la creación de proteínas de unión alternativas, basadas en armazones con inmunoglobulina (Holliger y Hudson, (2005) Nat Biotechnol 23: 1126-1136) o en topologías de proteínas completamente diferentes (Binz y col., (2005) Nat Biotechnol 23: 1257- 1268). Por ejemplo, se ha informado el uso de fragmentos Fv fusionados con dominios de unión a Fc de proteína A (Ito y Kurosawa, (1993) J Biol Chem 268: 20668-20675), estreptavidina central para la formación de un complejo tetramérico (Dubel y col., (1995) J Immunol Methods 178: 201-209), o el dominio de tetramerización humano del factor de transcripción p53 (Rheinhecker y col., (1996) J Immunol 157: 2989-2997). Se han adoptado recientemente fragmentos de armazón de proteína no IgG, tales como "anticolinas" (Skerra, (2000) Biochim Biophys Acta 1482: 337-350), "repeticiones de anquirina" (Binz y col., (2004) Nat Biotechnol 22: 575-582), "moléculas de Affibody" (Nord y col., (1997) Nat Biotechnol 15: 772-777), y el dominio tipo C similar a lectina de tetranectina (Christian y col., Publicación Internacional No. WO 98/56906; Graversen y col., (2000) J Biol Chem 275: 37390-37396) para aumentar la afinidad de unión al objetivo, la estabilidad térmica y la sensibilidad. Sin embargo, algunas de estas moléculas son fragmentos heteroantigenéticos o componentes no naturales del plasma, y se asocian con el riesgo de una respuesta inmune que podría limitar severamente aplicaciones terapéuticas potenciales.

Se utilizó un armazón de fusión de péptido de tipo colágeno formador de triplex para formar un aglutinante de proteína multivalente térmicamente estable para demostrar en el presente documento que CSA es una nueva plataforma que permite mejoras en la afinidad funcional y la mitogenicidad de los anticuerpos terapéuticos. Más importante aún, se ha comprobado que la fusión del scFv y los dominios del armazón similar al colágeno en CSA lleva a cada dominio a plegarse correctamente, sin comprometer las actividades de unión al objetivo o el ensamblaje trimérico de la estructura de triple hélice. El dominio de tipo colágeno formador de triplex puede usarse como armazón para fármacos proteicos existentes o nuevos trimerizando (incluso oligomerizando a través de apilamiento fibrilar de colágeno o entrecruzamiento de disulfuro intercatenarario de las moléculas triméricas que son similares a los de la familia de colágeno de defensa) la proteína activa en un enfoque de proteína de fusión, que implica hormonas proteicas, citoquinas, linfocinas, factores de crecimiento, lectinas, enzimas y fragmentos de receptores solubles; o moléculas de adhesión, tales como selectinas e integrinas.

Un complejo proteico o polipéptido de la invención se puede obtener mediante tecnología recombinante. Se pueden introducir en las células huésped adecuadas ácidos nucleicos que codifican polipéptidos del complejo y expresar los polipéptidos en una condición que permita la expresión de polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos y la formación de una espiral de triple hélice entre los polipéptidos. Para facilitar la formación del armazón de bobina de triple hélice, se puede coexpresar en las células huésped prolil 4-hidroxilasa (P4H), una enzima clave en la biosíntesis de colágeno.

Un dominio de proteína heterólogo puede contener un "dominio de unión", que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo o un fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno del mismo). El término "anticuerpo" como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula de inmunoglobulina o a una porción inmunológicamente activa de la misma, es decir, una porción de unión a antígeno. Se refiere a una proteína que comprende al menos una, y preferiblemente dos, regiones variables de cadena pesada (H) (V_H) y al menos una y preferiblemente dos regiones variables de cadena ligera (L) (V_L). Por lo tanto, un "dominio de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo, e incluye dominios V_H , V_L o Fab, fragmentos Fv de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) y dominios VHH (véase WO 94/4678).

Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). La extensión de la región marco y de CDR ha sido definida con precisión (véase, Kabat y col., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Servicios Humanos y de Salud de EE. UU., Publicación de los NIH No. 91-3242, y Chothia y col. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Cada V_H y V_L se compone normalmente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo terminal amino hasta el extremo terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. El anticuerpo puede incluir además una región constante de cadena pesada y ligera, para formar de ese modo una cadena de inmunoglobulina pesada y ligera, respectivamente. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L . La región variable de cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos típicamente median la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, que incluyen diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico de complemento.

Como se usa en este documento, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina humana reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de la inmunoglobulina. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 kD o 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de región variable en el extremo terminal NH_2 (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante kappa o lambda en el extremo terminal $COOH$. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 kD o 446 aminoácidos) están codificadas de manera similar por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante antes mencionados, por ejemplo, gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos).

El término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o "porción de anticuerpo" o "fragmento"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que conservan la capacidad de unirse específicamente a su ligando, o antígeno, por ejemplo, polipéptido EGFR o CD3 o un fragmento del mismo.

Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H ; (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR), y (vii) dominios V_L o V_H . Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que el par de regiones V_L y V_H para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242: 423-426, y Huston y otros (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también están englobados dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo puede producirse de forma recombinante, por ejemplo, producirse mediante presentación en fagos o mediante procedimientos combinatorios. La presentación en fago y los métodos combinatorios para generar anticuerpos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ladner y col., patente de los Estados Unidos No. 5.223.409; Kang y col., publicación internacional No.

WO 92/18619; Dower y col., publicación internacional No. 25 WO 91/17271; Winter y col., publicación internacional WO 92/20791; Markland y col., publicación internacional No. WO 92/15679; Breitling y col., publicación internacional WO 93/01288; McCafferty y col., publicación internacional No. WO 92/01047; Garrard y col., publicación Internacional No. WO 92/09690, Ladner y col., publicación internacional No. WO 90/02809, Fuchs y col. (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372, Hay y col. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3: 81-85; Huse y col. (1989) Science 246: 1275-1281; Griffiths y col. (1993) EMBO J 12: 725-734; Hawkins y col. (1992) J Mol Biol 226: 889-896; Clackson y col. (1991) Nature 352: 624-628; Gram y col. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89: 3576-3580; Garrad y col. (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom y col. (1991) Nuc Acid Res 19: 4133-4137; y Barbas y col. (1991) Proc Natl Acad Sci. USA 88: 7978-782).

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano (por ejemplo, un anticuerpo fabricado en un ratón que se ha modificado por ingeniería genética para producir un anticuerpo a partir de una secuencia de inmunoglobulina humana), o un anticuerpo no humano, por ejemplo, un anticuerpo de roedor (ratón o rata), cabra, primate (p. ej., mono) o de camello. Preferiblemente, el anticuerpo no humano es un anticuerpo de roedor (anticuerpo de ratón o rata). Los métodos para producir anticuerpos de roedor son conocidos en la técnica.

Se pueden generar anticuerpos monoclonales humanos usando ratones transgénicos que portan los genes de inmunoglobulina humana en lugar del sistema de ratón. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés se usan para producir hibridomas que secretan mAb humanos con afinidades específicas por epítopos de una proteína humana (véase, por ejemplo, Wood y col. Solicitud internacional WO 91/00906, Kucheralapati y col. PCT publicación 15 WO 91/10741; Lonberg y col., solicitud internacional WO 92/03918; Kay y col., solicitud internacional 92/03917; Lonberg y col., (1994) Nature 368: 856-859; Green, LL y col. (1994) Nature Genet., 7: 13-21; Morrison y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855; Bruggeman y col. (1993) Year Immunol 7: 33-40; Tuailon y col. 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720-3724; Bruggeman y col. (1991) Eur J Immunol 21: 1323-1326).

Un anticuerpo puede ser uno en el que la región variable, o una porción de la misma, por ejemplo, las CDR, se generan en un organismo no humano, por ejemplo, una rata o un ratón. Se pueden usar anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados. Los anticuerpos generados en un organismo no humano, por ejemplo, una rata o un ratón, y luego modificados, por ejemplo, en el marco variable o región constante, para disminuir la antigenicidad en un humano, están dentro de la invención.

Los anticuerpos quiméricos se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, un gen que codifica la región constante de Fc de una molécula de anticuerpo monoclonal de murino (u otra especie) se digiere con enzimas de restricción para eliminar la región que codifica el Fc murino, y la porción equivalente de un gen que codifica una región constante Fc humana se sustituye (véase Robinson y col., publicación de patente internacional PCT/US86/02269; Akira, y col., solicitud de patente europea 184.187; Taniguchi, M., solicitud de patente europea 171.496; Morrison y col., solicitud de patente europea 173.494; Neuberger y col., solicitud internacional WO 86/01533; Cabilly y col., patente de los Estados Unidos No. 4.816.567; Cabilly y col., solicitud de patente europea 125.023; Better y col. (1988) Science 240: 1041-1043; Liu y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu y col., (1987) J Immunol. 139: 3521-3526; Sun y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Nishimura y col., (1987) Canc. Res. 47: 999-1005; Wood y col. (1985) Nature 314: 446-449; y Shaw y col., (1988) J. Natl Cancer Inst. 80: 1553-1559.

Un anticuerpo humanizado o injertado con CDR tendrá al menos una o dos, pero, en general, las tres CDR del receptor (de cadenas de inmunoglobulina pesadas y/o ligeras) sustituidas por una CDR del donante. El anticuerpo puede reemplazarse con al menos una porción de una CDR no humana o solo algunas de las CDR pueden reemplazarse con CDR no humanas. Solo es necesario reemplazar el número de CDR requeridas para la unión del anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo. Preferiblemente, el donante será un anticuerpo de roedor, por ejemplo, un anticuerpo de rata o ratón, y el receptor será un marco humano o un marco de consenso humano. Típicamente, la inmunoglobulina que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina que proporciona la estructura se denomina "aceptor". En una realización, la inmunoglobulina donante es una no humana (por ejemplo, de roedor). El marco aceptor es un marco natural (por ejemplo, uno humano) o un marco de consenso, o una secuencia de aproximadamente 85% o más, preferiblemente 90%, 95%, 99% o más, idéntica al mismo. Como se usa en este documento, el término "secuencia consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) más frecuentes en una familia de secuencias relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987). En una familia de proteínas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que ocurre con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos ocurren con la misma frecuencia, cualquiera de ellos puede incluirse en la secuencia consenso. Un "marco de consenso" se refiere a la región marco en la secuencia consenso de inmunoglobulina.

Un anticuerpo se puede humanizar mediante métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanizados pueden generarse reemplazando secuencias de la región variable Fv que no están directamente implicadas en la unión del antígeno con secuencias equivalentes de regiones variables de Fv humano. Los métodos generales para generar anticuerpos humanizados son proporcionados por Morrison, S. L., (1985) Science 229: 1202-1207, por Oi y

col., (1986) Bio Techniques 4: 214, y por Queen y col. Patentes de Estados Unidos Nos. 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762. Dichos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican todas o parte de las regiones variables Fv de inmunoglobulina de al menos una de una cadena pesada o ligera. Las fuentes de dicho ácido nucleico son bien conocidas por los expertos en la técnica y, por ejemplo, se pueden obtener a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo contra un polipéptido de interés o fragmento del mismo. El ADN recombinante que codifica el anticuerpo humanizado, o fragmento del mismo, puede a continuación clonarse en un vector de expresión apropiado.

Los anticuerpos humanizados en los que se han sustituido, eliminado o añadido aminoácidos específicos también se pueden fusionar al armazón. Los anticuerpos humanizados preferidos tienen sustituciones de aminoácidos en la región marco, tales como para mejorar la unión a un antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado tendrá residuos en el marco idénticos al resto del marco del donante o a otro aminoácido distinto del residuo del marco del receptor. Para generar tales anticuerpos, un pequeño número seleccionado de residuos del marco aceptor de la cadena de inmunoglobulina humanizada puede reemplazarse por los aminoácidos correspondientes del donante. Las ubicaciones preferidas de las sustituciones incluyen residuos de aminoácidos adyacentes a la CDR, o que son capaces de interactuar con una CDR. Los criterios para seleccionar aminoácidos del donante se describen en la patente de Estados Unidos No. 5.585.089. Otras técnicas para humanizar anticuerpos se describen en Padlan y col. EP 519596 A1.

En una realización, cada polipéptido de un anticuerpo trimérico no contiene un dominio NC1 de colágeno. En una realización, cada polipéptido de un anticuerpo trimérico no contiene un nudo disulfuro. En una realización, cada polipéptido de un anticuerpo trimérico no contiene un dominio foldón de fibrina de bacteriófago T4.

Preferiblemente, el armazón de un anticuerpo trimérico es de un tamaño mínimo. Aquí se describe un dominio de tipo colágeno que comprende la secuencia (G-P-P/O)₁₀. Cada polipéptido puede comprender menos de 13 repeticiones de G-X-Y. El anticuerpo trimérico puede comprender menos de 35, 40, 45 o 50 repeticiones de G-P-P/O. En ciertas realizaciones, cada polipéptido de un anticuerpo trimérico tiene un peso molecular de menos de 35, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 kD. En una realización, el anticuerpo soluble trimérico tiene un peso molecular de menos de 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 o 150 kD.

Se describe en el presente documento un anticuerpo soluble trimérico que comprende tres polipéptidos, en el que cada polipéptido comprende un dominio de armazón de colágeno que comprende al menos 10 repeticiones de G-X-Y, y en el que al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 de los residuos Y son hidroxiprolina; y un dominio de anticuerpo, en el que los dominios de tipo colágeno de los tres polipéptidos interaccionan entre sí para formar un anticuerpo soluble trimérico que se une específicamente a un ligando con una avidez de al menos 10^7 M^{-1} .

La invención también incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que forma un complejo de proteína de esta invención. El ácido nucleico puede cribarse de la biblioteca de presentación en fagos o aislarse (por ejemplo, mediante RT-PCR) a partir de líneas celulares que expresan los anticuerpos o derivados de anticuerpos adecuados descritos anteriormente. El ácido nucleico se puede ligarse funcionalmente en un vector de expresión. Las células transformadas con el ácido nucleico o vector pueden usarse para producir el polipéptido de fusión descrito en la presente memoria o el complejo de proteína de esta invención. Las células útiles para producir un anticuerpo incluyen células de insecto y células de mamífero. Estas células incluyen, pero no se limitan a, células NS0 de mieloma, células CHO y células linfáticas.

La invención abarca métodos para generar un anticuerpo soluble trimérico uniendo un ácido nucleico que comprende un dominio de armazón de colágeno como se define en las reivindicaciones con ácido nucleico que comprende un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, usando técnicas moleculares convencionales. El dominio de armazón de colágeno puede unirse directamente al dominio de unión a antígeno o puede separarse mediante secuencias adicionales, tales como secuencias de nucleótidos que codifican una región de bisagra. El ácido nucleico puede expresarse en un sistema celular que permite la hidroxiprolinación, como las células NS0.

En una realización, la invención abarca un método para generar un anticuerpo soluble trimérico uniendo un ácido nucleico que codifica un dominio de tipo colágeno como se define en las reivindicaciones en marco con un ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno para un ligando. El dominio de tipo colágeno puede comprender más de 10 repeticiones de G-X-Y. El dominio de tipo colágeno puede comprender 10-30 repeticiones de G-X-Y; en donde G es glicina, X es cualquier aminoácido, y Y es cualquier aminoácido, y en el que al menos 10 de las repeticiones de G-X-Y son G-P-P. En la presente invención, el dominio de tipo colágeno se une en marco con un ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno para un ligando; y expresa el polipéptido codificado en una célula que hidroxiprolina al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 de las repeticiones de G-P-P en el segundo de los dos residuos P; en el que los dominios similares a colágeno hidroxiprolinados de tres polipéptidos interaccionan entre sí para formar un anticuerpo soluble trimérico que se une específicamente al ligando con una avidez de al menos 10^7 M^{-1} .

En una realización, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando de más de 10^7 M^{-1} . En una realización, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando de más de 10^8 M^{-1} . En una realización, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando de más de 10^9 M^{-1} . En ciertas realizaciones, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando entre 10^7 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} , entre 10^7 M^{-1} y 10^9 M^{-1} , entre 10^7 M^{-1} y 10^8 M^{-1} , entre 10^8 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} , entre 10^8 M^{-1} y 10^9 M^{-1} , y entre 10^9 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} .

En una realización, el ligando para el anticuerpo soluble trimérico es el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. En una realización, el ligando para el anticuerpo soluble trimérico es HER2/neu humano. En una realización, el ligando para el anticuerpo soluble trimérico es CD3 humano. En una realización, el ligando para el anticuerpo soluble trimérico es HER2/neu humano. En una realización, el ligando para el anticuerpo soluble trimérico es TNF- α humano.

Las proteínas del dominio de armazón y las proteínas de fusión de dominio de armazón se pueden expresar a partir de vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido y puede incluir un plásmido, cósmido o vector viral. El vector puede ser capaz de replicación autónoma o puede integrarse en un ADN huésped. Los vectores virales incluyen, por ejemplo, retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados. La expresión de proteínas en procariontes se lleva a cabo con mayor frecuencia en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no de fusión.

Los vectores de fusión pueden añadir una cantidad de aminoácidos a una proteína codificada en ellos, habitualmente al extremo terminal amino de la proteína recombinante. Dichos vectores de fusión típicamente tienen tres propósitos: 1) aumentar la expresión de la proteína recombinante; 2) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como un ligando en la purificación por afinidad. A menudo, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión de la porción de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante de la porción de fusión posterior a la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen el Factor Xa, trombina y enteroquinasa.

Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, DB y Johnson, KS (1988) Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante objetivo.

Maximizar la expresión de proteína recombinante en *E. coli* es para expresar la proteína en una bacteria huésped con una capacidad deteriorada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante (Gottesman, S., (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. 119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico a insertar en un vector de expresión de modo que los codones individuales para cada aminoácido sean los utilizados preferentemente en *E. coli* (Wada y col., (1992) Nucleic Acids Res. 20: 2111-2118). Tal alteración de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención se puede llevar a cabo mediante técnicas estándar de síntesis de ADN.

Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Las proteínas de la invención pueden expresarse en células bacterianas (tales como *E. coli*), células de insectos, levadura o células de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS (células de riñón de mono verde africano CV-1 de origen en células de SV40; Gluzman (1981) Cell 23: 175 182)). Los expertos en la técnica conocen otras células huésped adecuadas.

El ADN del vector puede introducirse en las células huésped mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usa en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en el arte para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluyendo fosfato de calcio o coprecipitación con cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación.

La invención abarca un método *in vitro* para modular la actividad biológica de un ligando como se define en las reivindicaciones, que comprende incubar un anticuerpo soluble trimérico que comprende tres polipéptidos con el ligando; en el que la unión del anticuerpo soluble trimérico al ligando inhibe la actividad biológica del ligando. Cada polipéptido puede comprender un dominio de armazón de colágeno que comprende al menos 10 repeticiones de G-X-Y; donde G es glicina, X es cualquier aminoácido, y Y es cualquier aminoácido, en donde al menos 10 de las repeticiones de G-X-Y son G-P-P o G-P-O, en donde al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 de las repeticiones de G-X-Y son G-P-O, y en donde P es prolina y O es hidroxiprolina; y un dominio de anticuerpo. En el método de este aspecto de la invención, los dominios de tipo colágeno de tres polipéptidos interactúan entre sí para formar un anticuerpo soluble trimérico que se une a un ligando con una avidez de al menos 10^7 M^{-1} .

En una realización, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando de más de 10^7 M^{-1} . En una realización, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando de más de 10^8 M^{-1} . En una realización, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando de más de 10^9 M^{-1} . En ciertas realizaciones, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando entre 10^7 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} , entre 10^7 M^{-1} y 10^9 M^{-1} , entre 10^7 M^{-1} y 10^8 M^{-1} , entre 10^8 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} , entre 10^8 M^{-1} y 10^9 M^{-1} , y entre 10^9 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} .

En ciertas realizaciones, el ligando para el anticuerpo soluble trimérico es el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, HER2/neu humano, CD3 humano, HER2/neu humano o TNF- α humano.

Un complejo de proteína de esta invención se puede conjugar con una porción terapéutica tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion radiactivo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracín-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, maitansinoides, por ejemplo, maitansinol (véase la patente de los Estados Unidos No. 5.208.020), CC-1065 (véanse las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.475.092, 5.585.499 y 5.846.545) y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, CC-1065, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramizina (AMC)) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina, vinblastina, taxol y maitansinoides).

Los iones radiactivos contemplados en las realizaciones de la invención incluyen, pero no están limitados a, ¹¹¹Indio, ¹¹³Indio, ⁹⁹Renio, ¹⁰⁵Renio, ¹⁰¹Renio, ⁹⁹Mtencio, ¹²¹Mtelurio, ¹²²Mtelurio, ¹²⁵Mtelurio, ¹⁶⁵Tulio, ¹⁶⁷Tulio, ¹⁶⁸Tulio, ¹²³Yodo, ¹²⁵Yodo, ¹²⁶Yodo, ¹³¹Yodo, ¹³³Yodo, ⁸¹Criptón, ³³Xenón, ⁹⁰Itrio, ²¹³Bismuto, ⁷⁷Bromo, ¹⁸Flúor, ⁹⁵Rutenio, ⁹⁷Rutenio, ¹⁰³Rutenio, ¹⁰⁵Rutenio, ¹⁰⁷MMercurio, ²⁰³Mercurio, ⁶⁷Galio, ⁶⁸Galio, ³⁵Azufre y ¹⁴Carbono.

Los conjugados pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada administrando el conjugado a un huésped. La porción del fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de Pseudomonas o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina 1 ("IL-1"), interleuquina 2 ("IL-2"), interleuquina 6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

En realizaciones adicionales de la invención, una proteína de fusión del dominio de armazón puede conjugarse con un polímero. Tales polímeros incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol, polipropilenglicol y poliol polioxietilado.

Los complejos proteicos y conjugados descritos anteriormente, basados en la especificidad de los dominios de unión heterólogos, pueden usarse para tratar diversos trastornos, que incluyen cánceres, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, enfermedades de la fibrosis y enfermedades cardiovasculares. En el presente documento se describe un método para tratar tales trastornos, por ejemplo, administrando a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un complejo proteico de la invención para tratar el trastorno. Se puede identificar que los sujetos a tratar tienen, o están en riesgo de adquirir, una afección caracterizada por el trastorno. Este método puede realizarse solo o junto con otros medicamentos o terapia.

Debido a la característica multiespecífica de un complejo de proteína de esta invención, se puede usar para unir moléculas o células que normalmente no están asociadas entre sí. Esta característica es particularmente útil para terapias basadas en células. En un ejemplo, un dominio heterólogo en el complejo de proteína es capaz de activar células citotóxicas (por ejemplo, células T citotóxicas) al unirse específicamente a un antígeno efector en las células citotóxicas, mientras que otro dominio heterólogo se une específicamente a un antígeno objetivo en una célula patógena o una célula maligna que se destruirá. De esta manera, el complejo de proteína puede tratar un trastorno causado por el patógeno o las células malignas.

El término "tratar" se define como la administración de una composición a un sujeto con el propósito de curar, aliviar, mitigar, remediar, prevenir o mejorar un trastorno, el síntoma del trastorno, el estado de la enfermedad secundario al trastorno, o la predisposición hacia el trastorno. Una "cantidad efectiva" es una cantidad de la composición que es capaz de producir un resultado médicamente deseable, por ejemplo, como se describió anteriormente, en un sujeto tratado.

La activación de la célula T citotóxica puede producirse a través de la unión del antígeno CD3 como un antígeno efector sobre la superficie de la célula T citotóxica mediante un complejo de proteína de la invención. Otros

antígenos efectores asociados a células linfoides incluyen el antígeno CD16 humano, el antígeno NKG2D, el antígeno Nkp46, el antígeno CD2, el antígeno CD28, el antígeno CD25, el antígeno CD64 y el antígeno CD89. La unión a estos antígenos efectores conduce a la activación de células efectoras tales como monocitos, granulocitos neutrófilos y células dendríticas. Estas células activadas ejercen entonces un efecto citotóxico o apoptótico sobre las células objetivo.

El antígeno objetivo es un antígeno que se expresa de manera única en una célula objetivo asociada con un estado de enfermedad, pero que no se expresa, se expresa en un nivel bajo o no es accesible en un estado saludable. Los ejemplos de tales antígenos objetivo asociados con células malignas incluyen EpCAM, CCR5, CD19, HER2/neu, HER3, HER4, EGFR, PSMA, CEA, MUC-1 (mucina), MUC2, MUC3, MUC4, MUC5.sub.AC, MUC5.sub.B, MUC7, beta-hCG, Lewis-Y, CD20, CD33, CD30, gangliósido GD3, 9-O-Acetil-GD3, GM2, Globo H, fucosil GM1, Poly SA, GD2, Carboanhidrasa IX (MN/CA IX), CD44v6, erizo Sonic (Shh), Wue-1, antígeno de células plasmáticas, IgE (unida a membrana), proteoglicano de sulfato de condroitina de melanoma (MCSP), CCR8, precursor de TNF- α , STEAP, mesotelina, antígeno A33, antígeno prostático de células madre (PSCA), Ly-6, desmogleina 4, neoepítipo de cadherina E, receptor de acetilcolina fetal, CD25, marcador CA19-9, marcador CA-125 y receptor de sustancia inhibidora muelleriana (MIS) tipo II, sTn (antígeno Tn sialilado; TAC-72), FAP (antígeno de activación de fibroblastos), endosialina, EGFRvIII, LG, SAS y CD63.

En un enfoque *in vivo* descrito en la presente memoria, se administra a un sujeto una composición terapéutica (por ejemplo, una composición que contiene un complejo proteico de la invención). Generalmente, el complejo se suspende en un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina fisiológica) y se administra por vía oral o por infusión intravenosa, o se inyecta o implanta por vía subcutánea, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, intratraqueal o intrapulmonar.

La dosificación requerida depende de la elección de la vía de administración; la naturaleza de la formulación; la naturaleza de la enfermedad del sujeto; el tamaño, peso, área superficial, edad y sexo del sujeto; otros fármacos administrados; y el juicio del médico tratante. Las dosificaciones adecuadas están en el intervalo de 0,01-100,0 mg/kg. Las dosis adecuadas están en el intervalo de 0,01-100,0 mg/kg o más específicamente 0,1-100, 0,1-75, 0,1-50, 0,1-25, 0,1-10, 0,5-100, 0,5-75, 0,5-50, 0,5-25, 0,5-10, 1-100, 1-75, 1-50 o 1-25 mg/kg. Las dosis preferidas incluyen 1-10, 10-100, 10-75, 10-50, 10-25, 25-50, 50-75, 25-100, 25-50, 50-100 o 75-100 mg/kg. Más preferiblemente, las dosificaciones pueden variar de 1-2, 3-4, 5-6, 7-8 o 9-10 mg/kg. Las composiciones terapéuticas de la invención pueden administrarse diariamente, una vez, dos veces o tres veces o más por semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, preferiblemente entre 2 y 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas, y aún más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. Se esperan variaciones en la dosificación necesaria en vista de la variedad de composiciones disponibles y las diferentes eficiencias de varias rutas de administración. Por ejemplo, se esperaría que la administración oral requiera mayores dosificaciones que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar usando rutinas empíricas estándar para la optimización tal como se entiende bien en la técnica. La encapsulación de la composición en un vehículo de administración adecuado (por ejemplo, micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficacia de la administración, particularmente para administración oral.

El vehículo farmacéuticamente aceptable incluye un disolvente, un medio de dispersión, un recubrimiento, un agente antibacteriano y antifúngico, y un agente retardante de la absorción e isotónico. Específicamente, estos agentes pueden incluir solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; reguladores tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH de la composición farmacéutica se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

También se describe en el presente documento una composición farmacéutica que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un complejo de proteína de la invención. La composición farmacéutica puede usarse para tratar los trastornos enumerados anteriormente. El vehículo farmacéuticamente aceptable incluye un disolvente, un medio de dispersión, un recubrimiento, un agente antibacteriano y antifúngico, y un agente retardante de la absorción e isotónico. La composición farmacéutica puede formularse en formas de dosificación para diferentes rutas de administración utilizando métodos convencionales.

La eficacia de una composición de esta invención puede evaluarse tanto *in vitro* como *in vivo*. En los estudios *in vivo*, la composición se puede inyectar en un animal (por ejemplo, un modelo de ratón) y se puede acceder a sus efectos terapéuticos. Con base en los resultados, se puede determinar un intervalo de dosificación apropiado y una vía de administración.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "dirigido contra" y "específicamente se une a" significan que el anticuerpo o fragmento de un anticuerpo tiene una avidéz de al menos 10^{-6} M por su ligando.

Como se describe en este documento, la primera proteína de fusión de dominio de almacén puede ser una fusión de (GPP)₁₀ con un anticuerpo dirigido contra el EGFR. También como se describe en el presente documento, la proteína de fusión del dominio del almacén de colágeno puede ser una fusión del (GPP)₁₀ a un fragmento de un anticuerpo dirigido contra el EGFR, en donde el fragmento puede ser, pero no se limita a, un fragmento scFv, V_L, V_H o Fab.

También como se describe en el presente documento, la primera proteína de fusión de dominio de almacén de colágeno puede ser una fusión de (GPP)₁₀ con un anticuerpo dirigido contra CD3. También como se describe en el presente documento, la proteína de fusión del dominio del almacén de colágeno puede ser una fusión del (GPP)₁₀ a un fragmento de un anticuerpo dirigido contra CD3, en donde el fragmento puede ser, pero no se limita a, un fragmento scFv, V_L, V_H o Fab.

También como se describe en el presente documento, la primera proteína de fusión de dominio de almacén puede ser una proteína de fusión específica doble de (GPP)₁₀ con un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo contra EGFR y un anticuerpo o proteína de fusión dirigida contra CD3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra EGFR se puede fusionar al extremo del terminal N de (GPP)₁₀ y el anticuerpo o fragmento de un anticuerpo dirigido contra CD3 se puede fusionar con el extremo terminal C de (GPP)₁₀. Esto incluye, pero no se limita a la proteína de fusión del dominio del almacén de colágeno específico doble 763CSAOKT3. También como se describe en este documento, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra CD3 se puede fusionar al extremo terminal N de (GPP)₁₀ y el anticuerpo o fragmento de un anticuerpo dirigido contra EGFR se puede fusionar al extremo terminal C del (GPP)₁₀.

También como se describe en el presente documento, una primera proteína de fusión del dominio de almacén de colágeno puede ser una fusión entre (GPP)₁₀ y un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo dirigido contra EGFR, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se fusiona con el extremo terminal N o el extremo terminal C del (GPP)₁₀. Una segunda proteína de fusión del dominio de almacén de colágeno puede ser una fusión entre (GPP)₁₀ y un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo dirigido contra CD3, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se fusiona al extremo terminal N o al extremo terminal C del (GPP)₁₀.

En la presente memoria se describe la proteína 763_scFv-Col del dominio del almacén de colágeno scFv anti-EGFR.

En la presente memoria se describe la proteína OKT3_scFv-Col de fusión del dominio del almacén de colágeno scFv anti-CD3.

También como se describe en este documento, la primera proteína de fusión de dominio de almacén de colágeno puede ser una fusión del (GPP)₁₀ con un anticuerpo dirigido contra TNF- α . También como se describe en el presente documento, la proteína de fusión del dominio del almacén de colágeno puede ser una fusión del (GPP)₁₀ con un fragmento de un anticuerpo dirigido contra el TNF- α , en donde el fragmento puede ser, pero no se limita a, un fragmento scFv, V_L, V_H, o Fab.

En la presente memoria se describe la proteína 357_scFv-Col de fusión del dominio del almacén de colágeno scFv anti-TNF- α .

También como se describe en el presente documento, la primera proteína de fusión de dominio de almacén de colágeno puede ser una proteína de fusión específica doble del (GPP)₁₀ con un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo dirigido contra TNF- α , EGFR y un anticuerpo o proteína de fusión dirigida contra CD3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra TNF- α , EGFR se puede fusionar con el extremo terminal N del (GPP)₁₀ y el anticuerpo o fragmento de un anticuerpo dirigido contra CD3 se puede fusionar con al extremo terminal C del (GPP)₁₀. También como se describe en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra CD3 puede fusionarse al extremo terminal N del (GPP)₁₀ y el anticuerpo o fragmento de un anticuerpo dirigido contra TNF- α , EGFR puede fusionarse al extremo terminal C del (GPP)₁₀.

También como se describe en el presente documento, una primera proteína de fusión de dominio de almacén de colágeno puede ser una fusión entre (GPP)₁₀ y un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo dirigido contra TNF- α , donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se fusiona con al extremo terminal N o al extremo terminal C de (GPP)₁₀. Una segunda proteína de fusión de dominio de almacén puede ser una fusión entre (GPP)₁₀ y un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo dirigido contra CD3, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se fusiona al extremo terminal N o al extremo terminal C del (GPP)₁₀.

También como se describe en el presente documento, la primera proteína de fusión del dominio de almacén de colágeno puede ser una proteína de fusión específica doble del (GPP)₁₀ tanto con un anticuerpo como con un fragmento de un anticuerpo contra EGFR y un anticuerpo o proteína de fusión dirigida contra CD3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra EGFR se puede fusionar al extremo terminal N del (GPP)₁₀ y el anticuerpo o fragmento de un anticuerpo dirigido contra CD3 se puede fusionar al extremo terminal C del (GPP)₁₀. También como se describe en este documento, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra CD3 se puede fusionar al

extremo terminal N del (GPP)₁₀ y el anticuerpo o fragmento de un anticuerpo dirigido contra EGFR se puede fusionar al extremo terminal C del (GPP)₁₀.

También como se describe en el presente documento, una primera proteína de fusión de dominio de armazón de colágeno puede ser una fusión entre (GPP)₁₀ y un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo dirigido contra EGFR, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se fusiona con el extremo terminal N o el extremo terminal C del (GPP)₁₀. Una segunda proteína de fusión del dominio del armazón de colágeno puede ser una fusión entre (GPP)₁₀ y un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo dirigido contra CD3, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se fusiona a ya sea el extremo terminal N o el extremo terminal C del (GPP)₁₀.

En realizaciones adicionales de la invención, una proteína de fusión del dominio de armazón de colágeno puede incluir la fusión a una proteína marcadora. Las proteínas marcadoras incluyen, pero no se limitan a, luciferasa, proteína fluorescente verde y proteína fluorescente verde mejorada. En este documento, se describe la proteína de fusión h4D5CSA-Luc del dominio del armazón de colágeno, que se dirige a HER2/neu.

Las proteínas de fusión del dominio de armazón de colágeno que incluyen proteínas marcadoras se pueden usar en diagnóstico y formación de imágenes moleculares. Las proteínas de fusión de dominio de armazón de colágeno que incluyen proteínas marcadoras o iones radioactivos u otras porciones de fusión pueden empacarse en un kit que incluye la proteína de fusión del dominio de armazón y otros reactivos necesarios para la formación de imágenes de moléculas específicas. Estos reactivos pueden incluir, pero sin limitación, reactivos para la preparación de muestras biológicas y reactivos para la visualización de la proteína marcadora.

La invención abarca un método para detectar un ligando como se define en las reivindicaciones, que comprende incubar un anticuerpo soluble trimérico que comprende tres polipéptidos con el ligando y detectar la unión del anticuerpo soluble trimérico al ligando. Cada polipéptido puede comprender un dominio de armazón de colágeno que comprende al menos 10 repeticiones de G-X-Y; donde G es glicina, X es cualquier aminoácido, y Y es cualquier aminoácido, en donde al menos 10 de las repeticiones de G-X-Y son GPP o GPO, en donde al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 de las repeticiones de G-X-Y son GPO, y en donde P es prolina y O es hidroxiprolina; y un dominio de anticuerpo. En el método de este aspecto de la invención, los dominios de tipo colágeno de tres polipéptidos interactúan entre sí para formar un anticuerpo soluble trimérico que se une a un ligando con una avidez de al menos 10^7 M^{-1} . Cada polipéptido puede comprender un dominio de armazón de colágeno que comprende al menos 10 repeticiones de G-X-Y; en donde G es glicina, X es cualquier aminoácido, y Y es cualquier aminoácido, en donde al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 de las repeticiones de G-X-Y son GXO, en donde O es hidroxiprolina; y un dominio de anticuerpo; en el que los dominios de armazón de colágeno hidroxiprolinados de tres polipéptidos interactúan entre sí para formar un anticuerpo soluble trimérico que se une a un ligando con una avidez de al menos 10^7 M^{-1} .

[0134] En una realización, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando de más de 10^7 M^{-1} . En una realización, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando de más de 10^8 M^{-1} . En una realización, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando de más de 10^9 M^{-1} . En ciertas realizaciones, el anticuerpo trimérico soluble tiene una avidez por su ligando entre 10^7 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} , entre 10^7 M^{-1} y 10^9 M^{-1} , entre 10^7 M^{-1} y 10^8 M^{-1} , entre 10^8 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} , entre 10^8 M^{-1} y 10^9 M^{-1} , y entre 10^9 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} .

En ciertas realizaciones, el anticuerpo soluble trimérico comprende un polipéptido de luciferasa.

Las realizaciones de la invención incluyen un complejo de proteína recombinante que comprende una primera cadena polipeptídica de fusión que contiene un primer dominio de armazón de colágeno y un primer dominio heterólogo fusionado a un extremo del primer dominio de armazón; una segunda cadena polipeptídica de fusión que contiene un segundo dominio de armazón de colágeno; y una tercera cadena polipeptídica de fusión que contiene un tercer dominio de armazón; en donde el primer, segundo y tercer dominios de armazón están alineados para formar una bobina de triple hélice.

En realizaciones adicionales, la invención proporciona un complejo proteico en el que la primera cadena polipeptídica de fusión contiene además un segundo dominio heterólogo fusionado al otro extremo del primer dominio del armazón de colágeno. Otras realizaciones de la invención incluyen complejo de proteína en el que el primer dominio heterólogo contiene la secuencia de un primer anticuerpo de cadena sencilla que se une específicamente a CD3 o un segundo dominio heterólogo que contiene la secuencia de un segundo anticuerpo de cadena sencilla que se une específicamente a EGFR.

En otras realizaciones de la invención, el complejo de proteína incluye una segunda cadena de polipéptido de fusión que comprende un tercer dominio heterólogo fusionado a un extremo del segundo dominio de armazón y una segunda cadena de polipéptido de fusión que comprende un cuarto dominio heterólogo fusionado al otro extremo del segundo dominio de armazón, una tercera cadena de polipéptido de fusión contiene un quinto dominio heterólogo fusionado a un extremo del tercer dominio de armazón y un sexto dominio heterólogo fusionado al otro extremo del tercer dominio de armazón, donde cada repetición contiene una secuencia de (GPP)₁₀.

Los ejemplos específicos a continuación se deben considerar meramente ilustrativos, y no limitativos del resto de la divulgación de ninguna manera. Sin una elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, con base en la presente descripción, utilizar la presente invención en su máxima extensión.

5 Ejemplo 1

Selección de la biblioteca de fagos para el dominio del anticuerpo anti-EGFR

10 Se aisló un fagémido erb que contenía un fragmento variable (scFv) de unión al dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR-ECD) mediante el cribado de bibliotecas de presentación de fagos de scFv humano de un solo pliegue (Tomlinson I + J, amablemente proporcionado por IM Tomlinson y G. Winter, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Reino Unido). Las selecciones se realizaron usando inmunotubos (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Dinamarca) recubiertos con 10 µg del dominio extracelular recombinante purificado del receptor de EGF (EGFR-ECD; Research Diagnostics, Inc.). El bloqueo, barrido, lavado, elución y reamplificación del fago eluido se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se identificaron un número de clones. 15 Después de la confirmación mediante transferencia Western y ELISA, se seleccionó un clon, erb_scFv, para realizar más experimentos. El ADNc que codifica erb_scFv se obtuvo y se ligó en un vector de expresión mediante un método estándar. A continuación, se enumeran la secuencia polipeptídica de erb_scFv (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de nucleótidos que la codifica (SEQ ID NO: 2).

20 SEQ ID NO: 1

MetAlaGluValGlnLeuLeuGluSerGlyGlyGlyLeuValGlnProGlyGlySerLeu
ArgLeuSerCysAlaAlaSerGlyPheThrPheSerSerTyrAlaMetSerTrpValArg
GlnAlaProGlyLysGlyLeuGluTrpValSerAspIleGlyAlaSerGlySerAlaThr
SerTyrAlaAspSerValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspAsnSerLysAsnThr
LeuTyrLeuGlnMetAsnSerLeuArgAlaGluAspThrAlaValTyrTyrCysAlaLys
SerThrThrThrPheAspTyrTrpGlyGlnGlyThrLeuValThrValSerSerGlyGly
GlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerThrAspIleGlnMetThrGln
SerProSerSerLeuSerAlaSerValGlyAspArgValThrIleThrCysArgAlaSer
GlnSerIleSerSerTyrLeuAsnTrpTyrGlnGlnLysProGlyLysAlaProLysLeu
LeuIleTyrAspAlaSerAlaLeuGlnSerGlyValProSerArgPheSerGlySerGly
SerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerSerLeuGlnProGluAspPheAlaThrTyr
TyrCysGlnGlnTyrAlaAspTyrProThrThrPheGlyGlnGlyThrLysValGluIle
LysArg

SEQ ID NO: 2

ATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGATATTGGTGCTTCTGGTTCTGCTACA
TCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA
TCTACTACTACTTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAJCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGGTGGA
GGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTCGACGGACATCCAGATGACCCAG
TCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT
CAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTC
CTGATCTATGATGCATCCGCTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGA
TCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTAC
TACTGTCAACAGTATGCTGATTATCCTACTACGTTTCGGCCAAGGACCAAGGTGGAATC
AAACGG

25 El vector de expresión se expresó luego en la línea celular del insecto S2 de *Drosophila*. El erb_scFv anti-EGFR se purificó y se sometió a análisis de transferencia Western y ELISA para confirmar su especificidad contra EGFR.

30 Ejemplo 2

Dominio del anticuerpo CD3

35 Se realizó RT-PCR para obtener de líneas celulares de hibridoma ADNc que codifican la región variable de cadena pesada (V_H) y la región variable de cadena ligera (V_L) del anticuerpo monoclonal anti-CD3 OKT3. Luego, los dos ADNc se ligaron para generar una secuencia de fusión que codifica una proteína de fusión de V_H-V_L de OKT3. A continuación se enumeran la secuencia polipeptídica de esta proteína de fusión (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de ADNc que la codifica (SEQ ID NO: 4).

SEQ ID NO: 3

ValGlnLeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysMetSerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrArgTyrThrMetHisTrpValLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGluTrpIleGlyTyrIleAsnProSerArgGlyTyrThrAsnTyrAsnGlnLysPheLysAspLysAlaThrLeuThrThrAspLysSerSerSerThrAlaTyrMetGlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaArgTyrTyrAspAspHisTyrCysLeuAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrValThrValSerSerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerAspIleValLeuThrGlnSerProAlaIleMetSerAlaSerProGlyGluLysValThrMetThrCysSerAlaSerSerSerValSerTyrMetAsnTrpTyrGlnGlnLysSerGlyThrSerProLysArgTrpIleTyrAspThrSerLysLeuAlaSerGlyValProAlaHisPheArgGlySerGlySerGlyThrSerTyrSerLeuThrIleSerGlyMetGluAlaGluAspAlaAlaThrTyrTyrCysGlnGlnTrpSerSerAsnProPheThrPheGlySerGlyThrLysLeuGluLeuLysArg

5 SEQ ID NO: 4

GTCCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCC TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCT GGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAAT CAGAAGTTC AAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG CAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGAT GATCATTTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGA GCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATTGTGCTAACCCAGTCT CCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCA AGTGTAAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATT TATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCGAGTGGGTCTGGG ACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGC CAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTCCGGCTCGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGA

Ejemplo 3

10

Dominio de anticuerpo EGFR

Se realizaron los mismos procedimientos para obtener ADNc que codifican V_H y V_L del anticuerpo monoclonal anti-EGFR 528 y una secuencia de fusión que codifica una proteína de fusión de V_H - V_L del anticuerpo anti-EGFR 528. El anticuerpo monoclonal 528 se une a EGFR en membranas celulares, por ejemplo, en células A431 de carcinoma epidermoide humano. La secuencia polipeptídica de este anticuerpo de cadena sencilla 528 (SEQ ID NO: 5) y la secuencia de ADNc que la codifica (SEQ ID NO: 6) se enumeran a continuación.

15

SEQ ID NO: 5

20

ValLysLeuGlnGluSerGlySerGluMetAlaArgProGlyAlaSerValLysLeuProCysLysAlaSerGlyAspThrPheThrSerTyrTrpMetHisTrpValLysGlnArgHisGlyHisGlyProGluTrpIleGlyAsnIleTyrProGlySerGlyGlyThrAsnTyrAlaGluLysPheLysAsnLysValThrLeuThrValAspArgSerSerArgThrValTyrMetHisLeuSerArgLeuThrSerGluAspPheAlaValTyrTyrCysThrArgSerGlyGlyProTyrPhePheAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrValThrValSerSerGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerMetThrGlnThrProLeuSerLeuProValSerLeuGlyAspGlnAlaSerIleSerCysArgSerSerGlnAsnIleValHisAsnAsnGlyIleThrTyrLeuGluTrpTyrLeuGlnArgProGlyGlnSerProLysLeuLeuIleTyrLysValSerAspArgPheSerGlyValProAspArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuLysIleSerArgValGluAlaGluAspLeuGlyIleTyrTyrCysPheGlnGlySerHisHisProProThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGlu

SEQ ID NO: 6

GTCAAGCTGCAGGAGTCAGGGTCTGAGATGGCGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGCCCTGCAAGGCTTCTGGCGACACATTCACAGTTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCATGGACATGGCCCTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCAGGTAGTGGTGGTACTAACTACGCTGAGAAGTTCAAGAACAAGGTCATCTGACTGTAGACAGGTCTCCCGCACAGTCTACATGCACCTCAGCAGGCTGACATCTGAGGACTTTGCGGTCTATTATTGTACAAGATCGGGGGGTCCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACATAATAATGGAATCACCATTATTTAGAATGGTACCTGCAAAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCTGATCTACAAAGTTTCCGACCGATTCTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTAGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTTCAAGGTTTCACATCATCTCCACGTTTCGGCGGGGGACCAAGCTGGAA

Ejemplo 4

Fusión de dominios de anticuerpos al minicolágeno humano XXI

- 5 Los ADNc que codifican el erb anti-EGFR descrito anteriormente, V_H-V_L de OKT3 y V_H-V_L anti-EGFR 528 se fusionaron respectivamente en marco al ADNc de minicolágeno humano XXI que contiene una región bisagra de IgG humana, EPKSCDKTHTCPPCRSIP, en el extremo 5' y una secuencia de etiqueta de histidina en el extremo 3'. A continuación, se muestran el dominio de armazón del polipéptido de minicolágeno humano XXI y las secuencias de

10

SEQ ID NO: 7:

GlyGlyArgGluProLysSerCysAspLysThrHisThrCysProProCysProArgSer
 IleProGlyProProGlyProIleGlyProGluGlyProArgGlyLeuProGlyLeuPro
 GlyArgAspGlyValProGlyLeuValGlyValProGlyArgProGlyValArgGlyLeu
 LysGlyLeuProGlyArgAsnGlyGluLysGlySerGlnGlyPheGlyTyrProGlyGlu
 GlnGlyProProGlyProProGlyProGluGlyProProGlyIleSerLysGluGlyPro
 ProGlyAspProGlyLeuProGlyLysAspGlyAspHisGlyLysProGlyIleGlnGly
 GlnProGlyProProGlyIleCysAspProSerLeuCysPheSerValIleAlaArgArg
 AspProPheArgLysGlyProAsnTyrSer

(nota: Pro = Prolina o Hidroxiprolina)

15

SEQ ID NO: 8:

GGCGGCCGCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAAGATCT
 ATTCC'TGGGCCACCTGGTCCGATAGGCCAGAGGGTCCCAGAGGATTACCTGGT'TTGCCA
 GGAAGAGATGGTGTTCCTGGATTAGTGGGTGTCCCTGGACGTCCAGGTGTCAGAGGATTA
 AAAGGCC'TACCAGGAAGAAATGGGGAAAAAGGGAGCCAAGGGT'TGGGTATCCTGGAGAA
 CAAGGTCTCCTGGTCCCCAGGTCCAGAGGGCCCTCCTGGAATAAGCAAAGAAGGTCTT
 CCAGGAGACCCAGGTCTCCCTGGCAAAGATGGAGACCATGGAAAACCTGGAATCCAAGGG
 CAACAGGCCCCCCAGGCATCTGCGACCCATCACTATGTTTTAGTGTAATTGCCAGAAGA
 GATCCGTTTCAGAAAAGGACCAAACTATAGT

- 20 Se construyó OKT3mC21fd que contenía un scFv anti-CD3 en el extremo terminal amino derivado de IgG OKT3, una región bisagra de IgG humana, un polipéptido de minicolágeno humano XXI, seguido de un dominio foldón de fibrina T4 y una etiqueta de histidina. El dominio foldón de fibrina T4 del bacteriófago, que consiste en 27 aminoácidos, NH₂-GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL-COOH, y forma una estructura de tipo hélice β con un interior hidrófobo, fue suficiente para impulsar la trimerización y el plegamiento correcto del dominio de colágeno
- 25 (Frank y col. al., (2001) J Mol Biol 308: 1081-1089).

Los vectores de expresión resultantes para OKT3mC21 y OKT3mC21fd se transfectaron en células S2 de *Drosophila* que portan genes de prolil 4-hidroxilasa humanos expresados de forma estable, respectivamente. Las células se cultivaron en presencia de blasticidina para seleccionar células resistentes a blasticidina. Los sobrenadantes del cultivo celular se recogieron y se analizaron mediante transferencia Western con anticuerpo monoclonal 3E2, que reconoce el dominio NC1 del extremo terminal C del colágeno α1 (XXI). Como se muestra en la Fig. 2, se encontró que tanto OKT3mC21 como OKT3mC21fd formaban una estructura trimérica (indicada como T) bajo condiciones no reductoras. El trimero enlazado con disulfuro intracatenario (indicado como Mt) también se detectó tanto en OKT3mC21 como en OKT3mC21fd. Los resultados demuestran que la proteína de fusión heteróloga de OKT3_scFv no afecta la propiedad de trimerización del dominio de armazón de minicolágeno XXI, incluso sin ninguna estructura de trimerización tal como el dominio foldón T4.

30

35

Ejemplo 5

- 40 Fusión de dominios de anticuerpos a un dominio similar al colágeno

El dominio colagenoso de minicolágeno XXI se sustituyó por un péptido corto similar al colágeno térmicamente estable (Gly-Pro-Pro)₁₀ como una plantilla de armazón para los CSA. Se generaron ocho polipéptidos de fusión: erb_scFv-Col, OKT3_scFv-Col, 763_scFv-Col, 357_scFv-Col, erb_scFv-GPP₁₀, Col-erb_scFv, 763CSA-OKT3 y h4D5CSA-Luc. Otro péptido de tipo colágeno, (GPP)₅GKPGK(PGP)₆, se usó como armazón de trimerización para la construcción de 763_CSA2. Estas proteínas de fusión de dominio de armazón se expresaron de forma estable como proteínas secretoras solubles en células NS0 de mieloma de ratón.

45

Construcción de plásmidos recombinantes

50

El ADNc que codifica para el scFv de erb se amplificó por PCR a partir del fagémido erb. Se obtuvo una secuencia que codifica mAb OKT3 anti-CD3 IgG2a murino (Ortho Pharmaceutical Corporation) por el producto de transcripción inversa del hibridoma OKT3 (ATCC, CRL-8001). Los ADNc para el V_H y V_L del mAb OKT3 se obtuvieron por RT-

PCR con base en la secuencia de nucleótidos publicada. La fusión de PCR de scFv de erb y OKT3 se generó uniendo las cadenas V_H y V_L con un enlazador de glicina (GGGS)₃.

Los ADNc que codifican para V_H y V_L de mAb 763 se amplificaron por PCR usando conjuntos de cebadores
5 derivados de los ADNc de panitumumab (Vectibix, Amgen, Inc) basándose en la secuencia de nucleótidos publicada
(patente de los EE. UU. No. 6.235.883). La fusión por PCR de scFv 763 se generó uniendo las cadenas V_H y V_L con
un enlazador de glicina (GGGS)₃.

Se realizó RT-PCR para obtener los ADNc que codifican la región variable de cadena ligera (V_L) y la región variable de cadena pesada (V_H) de un anticuerpo monoclonal 357 anti-TNF- α , derivado de la línea celular de hibridoma 357-101-4 (ECACC No. 92030603), un mAAb anti-TNF- α humano de ratón con fuerte actividad de neutralización. Luego, los dos ADNc se unieron con un enlazador de glicina (GGGGS)₃ (cursiva) para generar una secuencia de fusión que codifica una proteína de fusión de scFv 357. A continuación, se enumeran la secuencia polipeptídica de esta proteína de fusión (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de ADNc que la codifica (SEQ ID NO: 10).

SEQ ID NO: 9

GluIleValLeuThrGlnSerProProIleMetSerAlaSerProGlyGluLysValThr
MetThrCysSerAlaSerSerSerValSerPheMetTyrTrpTyrGlnGlnLysProGly
SerSerProArgLeuLeuIleTyrAspAlaSerIleLeuAlaSerGlyValProValArg
PheSerGlySerGlySerGlyThrSerTyrSerLeuThrIleSerArgMetGluAlaGlu
AspValAlaThrTyrTyrCysGlnGlnTrpSerAspTyrSerProArgThrPheGlyGly
GlyThrLysLeuGluIleGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGly
SerValLysLeuGlnGluSerGlyGlyGlyTrpValGlnProGlyGlySerMetLysLeu
SerCysIleAlaSerGlyPheThrPheSerAsnTyrTrpMetAsnTrpValArgGlnSer
ProGluLysGlyLeuGluTrpValAlaGluValArgLeuGlnSerAspAsnPheThrThr
HisTyrAlaGluSerValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspAspSerLysSerGly
ValTyrLeuGlnMetAsnAsnLeuGlyAlaGluAspThrGlyIleTyrTyrCysThrPro
PheAlaTyrTrpGlyGlnGlyThrThrValThrValSerSer

20 SEQ ID NO: 10

GAAATTGTGCTGACCCAGTCTCCACCGATCATGTCTGCTTCTCCAGGGGAGAAGGTCACCA
TGACCTGCAGTGCAGCTCAAGTTGTAAGTTTCATGTACTGGTACCAGCAGAGAAGCCAGGATC
CTCCCCCCAGACTCCTGATTATTGACGCATCCCATCTGGCTTCTGGAGTCCCCTGTTCGGCTTC
AGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTTACTCTCTACAACACGCCGGAATGGAGGCTGAAGATG
TTGCCACTTATTACTGCCAACAAATGGAGTGATTACTCACCCAGGACGTTCCGGTGGAGGCAC
CAAGCTGGAATTTGGGGAGGAGCGGTTTCAGGCCGGAGGTGGCTCTGGCGGTTGGCGGATCTCGGTG
AAACTGCAGAGAGTCTGGAGGAGGCTGGGTGCACCACTGGAGGATCCATGAAACTCTCTCTGTA
TTGCCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAACACTTGGATGAACCTGGGTCTCGCCAGTCTCCAGAGAA
GGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAGTTAGATTGCAATCTGATAATTTTACAACACATTATGCG
GAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCCACCATCTGCAGAGATGATTCCAAAAGTGGTGTCTACCTGC
AAATGAACAACCTTAGGAGTCTGAAGACACTGGCATTATTATTGTACCCCGTTTGCTTATTG
GGGGCAAGGGACCAACCGTACCAGCTCTCTCTCA

25 Para generar scFv-Col, la región codificante de scFv-Col incluía una secuencia de nucleótidos de scFv del extremo terminal N y un gen del extremo terminal C que codifica para una secuencia peptídica de PEKSCDKTHTCPPCRSIP(**GPP**)₁₀GICDPSLCFSVIARRDPFRKGPNY (SEQ ID NO: 11), que incluye una región bisagra de IgG humana (cursiva), un dominio de armazón similar a colágeno (en negrita) y el dominio NC1 de colágeno tipo XXI. A continuación, se muestran las secuencias del polipéptido y ADNc que contienen el armazón de colágeno sintético (SEQ ID NOs: 11 v 12, respectivamente).

SEQ ID NO: 11:

GluProLysSerCysAspLysThrHisThrCysProProCysProArgSerIleProGly
ProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGly
GlyProProGlyProProGlyProProGlyIleCysAspProSerLeuCysPheSerVal
IleAlaArgArgAspProPheArgLysGlyProAsnTyr

35 SEQ ID NO: 12:

GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAAGATCTATTCCTGGG
CCACCTGGTCCCCAGTCTCTCAGGACCCCCAGGGCCCCAGGCCCCCCCGGGCCGCCT
GGACCCCCAGGGCCACCAGGCCCCCCAGGCATCTGCGACCCATCACTATGTTTTAGTGTA
ATTGCCAGAAGAGATCCGTTTCAAAAAGGACCAAACTAT

Se preparó esta secuencia sintética (SEQ ID NO: 12) solapando la PCR y se clonó el producto de PCR que flanquea los sitios NotI y XhoI en el vector de expresión pSecTag2/Hygro (Invitrogen) en los mismos sitios. Los scFv de erb.

OKT3, 763 y 357 se clonaron luego en marco con la construcción que contiene el armazón de colágeno en el extremo terminal C anterior en los sitios *Ascl* y *NotI* para elaborar las construcciones de expresión de *erb_scFv-Col*, *OKT3_scFv-Col*, *763_scFv-Col* y *357_scFv-Col*, respectivamente.

A continuación, se generó *erb_scFv-GPP₁₀* para demostrar que el péptido del armazón de colágeno de la CSA, (*GPP*)₁₀, por sí mismo puede impulsar la formación de una proteína de fusión trimérica no covalentemente unida, sin la ayuda de los residuos de aminoácidos de entrecruzamiento intercatenar (tales como Cys y Lys) presentes dentro o que flanquean el dominio de tipo colágeno. La región codificante de *erb_scFv-GPP₁₀* incluía una secuencia de nucleótidos en el extremo terminal N de *erb_scFv* y un gen sintético en el extremo terminal C que codifica una secuencia peptídica de **GSP(*GPP*)₁₀GPSSGG**, que incluye un dominio de armazón similar a colágeno (en negrita). A continuación, se muestran el polipéptido que contiene el armazón de colágeno sintético y la secuencia de ADNc (SEQ ID NOs: 13 y 14, respectivamente).

SEQ ID NO: 13:

GlySerProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyPro
ProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProSerSerGlyGly
 (nota: Pro = Prolina o Hidroxiprolina)

SEQ ID NO: 14:

GGCAGCCCTGGGCCACCTGGTCCCACAGGTCTCCAGGACCCCCAGGGCCCCAGGCCCC
 CCQGGGCCGCTGGACCCCCAGGGCCACCAGGCCCCCAGGCCCTTCTCTGGCGGA

El ADNc de *erb_scFv* se clonó en marco a la secuencia de armazón de colágeno extremo terminal C anterior solapando PCR y se clonó el producto de PCR que flanqueaba con sitios *Ascl* y *AgeI* en el vector de expresión *pSecTag2/Hygro* (Invitrogen) para elaborar la construcción de expresión de *erb_scFv-GPP₁₀*.

A continuación, se elaboró *Col-erb_scFv*. La región del armazón de colágeno de *Col-erb_scFv* contiene una secuencia peptídica de *TCPPCPRSIP(GPP)₁₀GICDPSLC*, que incluye un dominio similar al colágeno (*GPP*)₁₀ que flanquea con dos nudos disulfuro, *TCPPCPRSIP* y *GICDPSLC*. A continuación, se muestran el polipéptido que contiene el armazón de colágeno sintético y la secuencia de ADNc (SEQ ID NOs: 15 y 16, respectivamente).

SEQ ID NO: 15:

ThrCysProProCysProArgSerIleProGlyProProGlyProProGlyProProGly
ProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProPro
GlyIleCysAspProSerLeuCys
 (nota: Pro = Prolina o Hidroxiprolina)

SEQ ID NO: 16:

ACATGCCACCGTGCCCAAGATCTATTCTGGGCCACCTGGTCCCCCAGGTCTCCAGGA
 CCCCCAGGGCCCCCAGGCCCCCGGGCCGCCTGGACCCCCAGGGCCACCAGGCCCCCA
 GGCATCTGCGACCCATCACTATGT

El ADNc de *erb_scFv* se clonó en marco con la secuencia del armazón de colágeno en el extremo terminal N anterior (SEQ ID NO: 16) solapando PCR y se clonó el producto de PCR que flanqueaba con sitios *BamHI* y *AgeI* en el vector de expresión *pSecTag2/Hygro* (Invitrogen) para elaborar la construcción de expresión de *Col-erb_scFv*.

A continuación, se elaboró *763CSA2*. La región codificante de *763CSA2* incluía un *763_scFv* (anti-EGFR) en el extremo terminal amino y un gen de armazón de colágeno sintético en el extremo terminal C que codifica una secuencia peptídica de *PEKSGDKHTHTCPPCPRSIP(GPP)₅GKPGKP(GPP)₆GICDPSLC* (SEQ ID NO: 17), que incluye una región de bisagra mutante de IgG humana (cursiva), un dominio de tipo colágeno (en negrita) y un nudo de disulfuro (*GICDPSLC*) de colágeno de tipo XXI. A continuación, se muestran las secuencias del polipéptido y de ADNc que contienen el armazón de colágeno sintético (SEQ ID NO: 17 y 18, respectivamente).

SEQ ID NO: 17:

GluProLysSerGlyAspLysThrHisThrCysProProCysProArgSerIleProGly
ProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyLysProGlyLysPro
GlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyIle
CysAspProSerLeuCys
 (nota: Pro = Prolina o Hidroxiprolina)

SEQ ID NO: 18:

GAGCCCAAATCTGGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAAGATCTATTCTGGG
CCACCTGGTCCCCCAGGTCTCCAGGACCCCCAGGGCCCCCAGGTAAACCTGGAAAACCA
GGGGCCCCAGGGCCCCCGGGCCGCTGGACCCCCAGGGCCACCAGGGCCCCCAGGCATC
TGCGACCCATCACTATGT

- 5 Se preparó esta secuencia sintética (SEQ ID NO: 17) solapando PCR y se clonó el producto de PCR que flanquea los sitios NotI y XhoI en el vector de expresión pSecTag2/Hygro (Invitrogen) en los mismos sitios. Los scFv de 763 se clonaron entonces en marco con la construcción que contiene el armazón de colágeno en el extremo terminal C anterior en los sitios AscI y NotI para elaborar los constructos de expresión de 763CSA2.
- 10 Se generó una CSA biespecífica, 763CSAOKT3, como sigue. El scFv de OKT3 se clonó en marco en el extremo terminal C de 763_scFv-Col en los sitios AgeI y BamHI para elaborar la construcción de expresión de 763CSAOKT3, donde se coloca un scFv anti-EGFR de 763 en el extremo terminal N, seguido de un polipéptido de armazón de colágeno (SEQ ID NO: 11) y un scFv anti-CD3 en el extremo terminal C de OKT3.
- 15 Se construyó otro compañero de unión bifuncional, h4D5CSA-Luc, como sigue. En primer lugar, se elaboró h4D5CSA fusionando un h4D5_scFv del extremo terminal amino, derivado de una IgG anti-HER2/neu humanizada (Carter y col. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89, 4285-4289) con el vector de expresión que contiene el armazón de colágeno del extremo terminal C como se menciona en la sección de la construcción de 763CSA2. A continuación, el ADNc de la luciferasa de *Gaussia* (patente de los Estados Unidos No. 6.232.107) se fusionó en el marco con el
- 20 extremo terminal C de h4D5_scFv-Col en los sitios AgeI y BamHI.

Cada marco de lectura abierto de las diversas moléculas scFv, scFv-Fc y CSA contiene secuencias que codifican una secuencia líder del extremo terminal N y etiquetas de epítipo *myc*/polihistidina del extremo terminal C para fines de secreción, detección y purificación.

- 25 En la Tabla a continuación se resumen varias proteínas/anticuerpos recombinantes codificados por las construcciones de expresión descritas anteriormente:

Tabla 1. Visión general de diversas moléculas de anticuerpo utilizadas en este estudio

Anticuerpo	Objetivo	Tipo	Estructura
erb_scFv-Col	EGFR-ECD	CSA ¹	Fig. 4A, panel a
erb_scFv-GPP ₁₀	EGFR-ECD	CSA	Fig. 4A, panel b
Col-erb_scFv	EGFR-ECD	CSA	Fig. 4A, panel c
erb_scFv-Fc	EGFR-ECD	scFv-Fc	Fig. 4B, panel b
erb_scFv	EGFR-ECD	scFv	Fig. 4B, panel c
OKT3_scFv-Col	CD3	CSA	Fig. 4A, panel a
IgG OKT3	CD3	IgG	Fig. 4B, panel a
763_scFv-Col	EGFR	CSA	Fig. 4A, panel a
763CSA2	EGFR	CSA	Fig. 4A, panel a
763CSAOKT3	EGFR y CD3	CSA biespecífica	Fig. 4A, panel d
h4D5CSA-Luc	HER2/neu	CSA bifuncional	Fig. 4A, panel e
357_scFv-Col	TNF- α	CSA	Fig. 4A, panel a
357 IgG	TNF- α	IgG	Fig. 4B, panel a

¹Anticuerpo de armazón de colágeno

- 30 Ejemplo 6

Expresión de proteínas recombinantes

- 35 Para generar los complejos/anticuerpos de proteínas recombinantes, se transfectaron las construcciones scFv, scFv-Fc y CSA descritas anteriormente en células NS0 de mieloma de ratón usando Effectene (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la selección con higromicina (400 μ g/mL) durante 4 semanas, cada clon estable se cultivó en un matraz agitador a una densidad inicial de siembra de 5×10^5 células/mL en un medio químicamente definido HyQCDM4NS0 (Hyclone) que contiene 2% de suero bovino fetal. El cultivo se mantuvo a 150
- 40 rpm durante cinco días a 37°C. Se añadió ascorbato de sodio (80 μ g/mL) al medio de cultivo diariamente para aquellas células que portaban construcciones de expresión que codifican proteínas que contenían los dominios de anticuerpo mencionados anteriormente y el dominio de armazón de colágeno, es decir, anticuerpos de armazón de colágeno (CSA).

45

Ejemplo 7

Purificación de proteínas recombinantes

Para purificar las proteínas CSA enumeradas en la Tabla 1, se aplicaron aproximadamente 2 L de cada medio de cultivo filtrado a una columna de gel T (1,5 x 8 cm, Pierce) equilibrada con regulador Tris-HCl 50 mM que contenía 0,5 M de KCl, pH 8,0 a un caudal de 60 mL/hora. Después de lavar con el mismo regulador, los complejos de proteínas o proteínas recombinantes se eluyeron con 50 mM de regulador de acetato de sodio, pH 4,0. Su absorbancia UV se controló a 280 nm y la fracción mayor se aplicó a una columna de Sefarosa High Trap quelante cargada con ZnSO₄ (1 mL en volumen de lecho, GE Healthcare) equilibrada con regulador Tris-HCl 50 mM que contenía NaCl 0,5 M, pH 8,0 a una velocidad de flujo de 60 mL/hora. La columna se lavó primero con 20 mM de imidazol y luego la proteína o los complejos de proteína unidos se eluyeron con 0,25 M de imidazol en el mismo regulador. La preparación final se dializó frente a 50 mM de regulador Hepes, pH 7,0. A continuación, se llevó a cabo SDS-PAGE usando un gel de poliacrilamida bis-Tris NuPAGE al 10% con MOPS o un gel de poliacrilamida SDS/Tris-acetato al 7% con acetato de sodio como regulador de operación (Invitrogen). Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie brillante R-250. Las densidades de las bandas de proteína se cuantificaron por densitometría usando Chemilmager 5500 (Alpha Inn8).

Estudios de trimerización

Para examinar la naturaleza de triple hélice, se incubó erb_scFv-Col purificado (1 mg/mL) a 37°C en ausencia o presencia de DTT 10 mM durante 1 h. Una alícuota de la muestra tratada con DTT se hizo reaccionar adicionalmente con N-etil-maleimida (NEM) 50 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear permanentemente sulfhidrilos libres y la reformación de trímeros. Se sometió a electroforesis una cantidad igual de proteína de cada muestra en un gel de poliacrilamida SDS/Tris-acetato al 7% con acetato de sodio como regulador de operación. El gel se tiñó con azul de Coomassie. Se descubrió que las CSA purificadas eran homotrímeros o hexámeros enlazados con disulfuro intercatenario, que se pueden disociar en dos trímeros en condiciones reductoras moderadas.

Se examinó la estabilidad térmica de la estructura trimérica de erb_scFv-Col. Se trató erb_scFv-Col purificada en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), que contenía urea 2 M, en ausencia o en presencia de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 10 mM a temperatura ambiente. Las muestras reducidas se alquilaron luego con 50 mM de NEM a temperatura ambiente. Cada muestra con una cantidad igual de proteína se calentó durante 10 minutos a 35, 45, 55, 65, 75 y 85°C antes de mezclar el regulador de carga de SDS. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS/Bis-Tris al 10% con el regulador MOPS en condiciones no reductoras. El gel se tiñó con azul de Coomassie. El resultado indicó que el trímero erb_scFv-Col exhibía una alta estabilidad térmica. De hecho, después de tratados a 65°C durante 10 minutos, más del 50% de los trímeros permanecieron. También se descubrió que la estructura trimérica del dominio de tipo colágeno de erb_scFv-Col era prolil hidroxilada.

La estructura primaria de erb_scFv-Col o OKT3-scFv-Col comprende un dominio de direccionamiento de Fv de cadena sencilla humano o de ratón, una región bisagra de IgG₁ humana, un péptido similar a colágeno (Gly-Pro-Pro)₁₀ y el dominio NC1 de colágeno tipo XXI. Los anticuerpos recombinantes de erb_scFv-Col, OKT3_scFv-Col, erb_scFv-Fc y erb_scFv se expresaron como proteínas secretoras solubles en células NS0 de mieloma de ratón y se purificaron individualmente a partir del medio de cultivo mediante cromatografía en columna como se describió previamente. La Fig. 5A representa el análisis de SDS-PAGE de estos anticuerpos purificados. En condiciones no reductoras, se resolvieron dos bandas principales en erb_scFv-Col (carril 2), mientras que solo se observó una sola banda principal en OKT3_scFv-Col (carril 3). La banda inferior tanto de erb_scFv-Col como de OKT3_scFv-Col migraron a una posición de 125 kD, que corresponde cercanamente a la masa molecular calculada de la forma trimérica de ambos monómeros de scFv-Col (41 kD). La banda superior que se muestra en erb_scFv-Col (carril 2) parece ser un dímero de trímeros unidos por disulfuro intercatenario.

Este hallazgo se confirmó incubando la muestra bajo condiciones de reducción suaves como se muestra en la Fig. 5B: el hexámero unido a disulfuro intercatenario (250 kD) de erb_scFv-Col se disoció en dos trímeros (125 kD). En la Fig. 5A, las muestras se trataron en condiciones reductoras con 50 mM de DTT durante 10 min a 70°C, y el hexámero unido por disulfuro intercatenario de erb_scFv-Col se redujo completamente a la forma trimérica, mientras que solo algunas del trímero erb_scFv-Col se disociaron adicionalmente en monómero (carril 7). Curiosamente, la conformación trimérica de OKT3_scFv-Col era resistente a la disociación en una forma monomérica bajo estas condiciones reductoras (carril 8). La contraparte bivalente del anticuerpo erb, erb_scFv-Fc migró como un dímero en condiciones no reductoras con una masa molecular aparente de 125 kD (carril 4), revelando una forma casi monomérica con una masa molecular aparente de 57 kD después de reducir los enlaces disulfuro intercatenarios. (carril 9).

Estos resultados implican que el péptido corto de tipo colágeno (Gly-Pro-Pro)₁₀ en las moléculas de CSA de erb_scFv-Col y OKT3_scFv-Col puede ser responsable del ensamblaje en una conformación trimérica estable térmicamente (véase a continuación). La contraparte monovalente del anticuerpo erb, erb_scFv, migró como una banda única con una masa molecular aparente de 28 kD en condiciones no reductoras o reductoras. Las estructuras

hexa y triméricas de las especies unidas por disulfuro intracatenario de erb_scFv-Col mostradas en la Fig. 5 se caracterizaron adicionalmente para determinar su estabilidad térmica de triple hélice. Para excluir la contribución de los puentes disulfuro intercatenarios al montaje trimérico de las moléculas de CSA, los residuos de cisteína en erb_scFv-Col se redujeron completamente primero usando un agente reductor fuerte TCEP a temperatura ambiente, y luego se alquilaban con NEM para evitar la reformación de los enlaces disulfuro. Se incubaron cantidades iguales de muestras no reducidas o reducidas/alquiladas en Tris-HCl (50 mM, pH 8) que contenían urea 2 M a las temperaturas indicadas y se analizó la disociación del triplex mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras para estimar la estabilidad térmica de la triple hélice de colágeno. Como se esperaba, la especie hexámera unida por disulfuro intercatenario se disoció fácilmente en trímeros a 35°C (Fig. 6A, compárense los carriles 1 y 4). Los trímeros se disociaron en monómeros significativamente a medida que se incrementó la temperatura de incubación (Fig. 6A, carriles 4-9). La temperatura de transición del punto medio (T_m) de erb_scFv-Col bajo 2 M de urea después de la reducción/alquilación se determinó que era 66°C, a la que la mitad del trímero se desplegó en monómeros (Fig. 6A). El mismo experimento en condiciones no reductoras (Fig. 6A, carriles 1-3) no mostró ninguna alteración de la estructura hexamérica o trimérica, aunque erb_scFv-Col se degradó parcialmente a altas temperaturas de incubación.

Este fenómeno es consistente con otros trabajos que demostraron que los péptidos que contienen GPP eran sensibles al calentamiento a 90°C, y se degradaban parcialmente, y que la introducción de 2,5 M de HCl de guanidinio en la muestra similar al colágeno redujo la T_m en 27 °C.

La hidroxiprolina es importante para la estabilidad térmica de una estructura triple de colágeno. Los análisis de la composición de aminoácidos se realizaron en una muestra purificada para investigar la presencia de hidroxiprolina en erb_scFv-Col. El erb_scFv-Col purificado se dializó frente a ácido acético 50 mM, se hidrolizó en 6 N de HCl a 110 °C durante 24 h y se sometió a análisis de aminoácidos en un sistema Waters Pico•Tag®. Se observó una coincidencia cercana entre la composición de aminoácidos determinada y los datos pronosticados basados en la secuencia de ADNc deducida de erb_scFv-Col (Tabla 2). Además, la posición máxima del derivado de hidroxiprolina se detectó en el perfil de elución de HPLC, sugiriendo que los residuos de Pro en la posición Y del triplete Gly-X-Y colagenoso en (Gly-Pro-Pro)₁₀ estaban sujetos a hidroxilación (Fig. 7).

El grado de hidroxilación de prolina en erb_scFv-Col es del 61%, según se determinó a partir del valor teórico de diez residuos de prolina totalmente hidroxilados en su motivo (Gly-Pro-Pro)₁₀ (véanse los residuos de Hyp en la Tabla 2). Los resultados indican que el motivo (Gly-Pro-Pro)₁₀ en moléculas de CSA es un buen sustrato para prolil 4-hidroxilasa y las células NS0 de mieloma de ratón exhiben suficiente actividad prolil hidroxilasa para la biosíntesis de moléculas de colágeno.

Tabla 2. Análisis de aminoácidos del erb_scFv-Col purificado expresado en células NSO

Aminoácido	erb_scFv-Col	Calculado ^a
Residuos		
Asx	22,2 ± 0,4 ^b	22
Glx	25,5 ± 0,3	26
Hyp	6,1 ± 0,4	10 ^c
Ser	36,0 ± 1,2	44
Gly	46,9 ± 0,5	47
His	7,8 ± 0,3	7
Arg	15,0 ± 0,4	15
Thr	22,9 ± 0,6	24
Ala	27,6 ± 0,3	26
Pro	32,4 ± 1,3	28
Tyr	12,8 ± 0,5	14
Val	16,1 ± 1,0	14
Met	4,6 ± 0,7	3
Cys	5,8 ± 1,8	9
Ile	13,2 ± 0,6	12
Leu	22,5 ± 1,1	20
Phe	11,2 ± 0,4	10
Lys	14,6 ± 0,9	12

^a Los residuos de aminoácidos calculados se basan en la secuencia de aminoácidos deducida de erb_scFv-Col después de la eliminación de la secuencia de señal.

^b Los valores se dan como media ± S.D., n = 3.

^c El valor se predice como los residuos de prolina en la posición Y de una secuencia de tripletes GXY colagenosa (Kivirikko y col., (1992) en Post-Translational Modifications of Proteins (Harding, J. J., y Crabbe, M. J. C., Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL.: 1-51).

La presencia de altos niveles de anticuerpos triméricos solubles en los sobrenadantes de cultivo indicó que las subunidades monoméricas que contienen un dominio de anticuerpo y un dominio de armazón podrían trimerizarse y secretarse. La presencia del dominio de anticuerpo dentro del mismo polipéptido como el dominio del armazón no

evitó la trimerización, no evitó la formación de un anticuerpo soluble, y no evitó la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo. Por lo tanto, la invención permite la trimerización de anticuerpos, la formación de un anticuerpo soluble y la secreción de anticuerpos triméricos solubles.

5 Ejemplo 9

Estudios de unión

Se midieron las cinéticas de unión de las variantes de anticuerpos erb al EGFR-ECD utilizando un biosensor BIAcore X (BIAcore, Inc., Uppsala, Suecia) en el regulador de operación HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% de tensioactivo P20). En resumen, se inmovilizó EGFR-ECD en un chip con sensor de CI a través de un acoplamiento de amina a un nivel de 1.700 unidades de respuesta (RU) y se inyectaron anticuerpos purificados con diferentes concentraciones a un caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. La superficie se regeneró por inyección de 5 μL de glicina-HCl 10 mM, pH 3,5. Se obtuvieron sensogramas para cada concentración y se evaluaron mediante el programa, BIA Evaluation 3.2. Los datos de unión se titularon con un modelo de unión Langmuir 1:1 para calcular la constante de disociación de equilibrio, K_D , que se definió como la relación de la tasa de disociación ($k_{\text{disociación}}$)/tasa de asociación ($k_{\text{asociación}}$). Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Cinética de unión de diversas formas de anticuerpo erb a EGFR-ECD inmovilizado

Anticuerpo	$k_{\text{asociación}}/10^5$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{disociación}}/10^{-4}$ s^{-1}	K_D nM
erb_scFv-Col	1,72	8,22	4,78
erb_scFv-Fc	0,909	94,4	104
erb_scFv	0,15	741	4960

Como se muestra en la Tabla 3, la avidéz de unión de erb_scFv-Col por EGFR-ECD es aproximadamente 20 y 1.000 veces más fuerte que las contrapartes de mAb bivalente (erb_scFv-Fc) y monovalente (erb_scFv), respectivamente.

El análisis de unión a anticuerpo demuestra que el diseño de la estructura de las moléculas de CSA no altera la actividad de unión de los dominios de scFv. La resonancia de plasmón superficial y la citometría de flujo celular se usaron para examinar si la actividad de unión de scFv se retiene en erb_scFv-Col y OKT3_scFv-Col, respectivamente. Además, el aumento en la avidéz de unión a antígeno por scFv trivalente en moléculas de CSA se comparó con el de sus contrapartes bivalentes y/o monovalentes. La interacción de las tres variantes de anticuerpos erb, erb_scFv-Col, erb_scFv-Fc y erb_scFv, con EGFR-ECD se estudió utilizando un ensayo de resonancia de plasmón superficial y la constante de disociación de equilibrio K_D se determinó como la relación entre las constantes de velocidad de disociación y asociación ($k_{\text{disociación}}/k_{\text{asociación}}$). La K_D de la unión de erb_scFv monovalente con ligandos EGFR-ECD es del orden de 10^{-6} M, mientras que la K_D de la unión de erb_scFv-Fc bivalente y erb_scFv-Col trivalente a EGFR es del orden de 10^{-7} y 10^{-9} M, respectivamente (Fig. 8 y Tabla 3). El aumento en la avidéz aparente de la CSA de erb trivalente sobre el de las contrapartes bivalentes y monovalentes es de aproximadamente 20 y 1.000 veces, respectivamente. Notablemente, la constante de la tasa de disociación ($k_{\text{disociación}}$) de erb_scFv-Col es $8,22 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, y para erb_scFv-Fc es $94,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, lo que representa una mejora de 11 veces en la tasa de disociación para la especie trivalente.

Se determinaron las afinidades funcionales de OKT3_scFv-Col e IgG OKT3 para unirse a moléculas de CD3 en la superficie celular de células T humanas CD3(+) mediante análisis de citometría de flujo utilizando un ensayo de desplazamiento de anticuerpos con una concentración saturada (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de OKT3-FITC como competidor. Todos los siguientes procedimientos se realizaron a 4°C. Se suspendieron las células T humanas en un regulador de FCM (solución salina regulada con fosfato con 2% de FBS y 0,1% de azida de sodio) a una densidad de 1×10^6 células/mL. Las células se trataron con IgG totales de ratón (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante 30 minutos y luego se incubaron con una dilución en serie de OKT3_scFv-Col o anticuerpo OKT3 durante 1 hora. Se añadió directamente una cantidad fija, saturante (determinada por citometría de flujo) de OKT3 conjugado con FITC (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, adquirido en eBioscience, Inc.). Después de la incubación durante 1 hora, las células se lavaron con el regulador de FCM y se analizaron por inmunofluorescencia mediante citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los datos se presentaron como porcentaje de inhibición de la intensidad de fluorescencia máxima, que se define como la intensidad de fluorescencia media obtenida por tinción de las células T con OKT3-FITC en ausencia de anticuerpos de bloqueo. Se calculó la concentración de cada mAb requerida para inhibir la mitad de la intensidad de fluorescencia máxima (IC_{50}).

Se calculó que la avidéz de unión de IgG OKT3 y OKT3_scFv-Col a las células T CD3(+) humanas era de 1,33 nM para IgG OKT3 y 0,45 nM para OKT3_scFv-Col. Por lo tanto, los valores de IC_{50} indicaron que la avidéz de la OKT3_scFv-Col trivalente por las células T CD3(+) es aproximadamente tres veces mayor que la de la IgG OKT3 bivalente (Fig. 9). Los resultados indicaron que OKT3_scFv-Col se une a las células T CD3+ humanas más fuertemente que el mAb OKT3 murino nativo.

Por lo tanto, los resultados de análisis de unión obtenidos usando resonancia de plasmón superficial y ensayos de unión a la célula revelan que tanto el erb trivalente como las CSA de OKT3 mejoran significativamente la avidéz de unión en comparación con sus contrapartes bivalentes. Los análisis de unión también muestran que los anticuerpos solubles triméricos de la invención pueden mostrar una afinidad de unión en el intervalo nanomolar. En consecuencia, con la invención se pueden conseguir anticuerpos triméricos solubles con altas afinidades por sus ligandos.

Ejemplo 10

Ensayos de estabilidad y farmacocinético

Para el ensayo de estabilidad en suero, se determinó la estabilidad de diversas formas de anticuerpo erb_scFv-Col, erb_scFv-Fc, o erb_scFv incubando con suero humano a 37°C. La cantidad de anti-EGFR activo restante después de diferentes períodos de tiempos de incubación se midió mediante ELISA cuantitativo. El ELISA se realizó empleando EGFR-ECD recombinante (como reactivo de captura) y mAb anti-c-myc (9E10, Sigma Chemical Co.), seguido de una IgG anti-ratón de cabra policlonal purificada por afinidad conjugada con HRP y sustratos quimioluminiscentes (Pierce Biotechnology, Inc.). Para el ensayo farmacocinético, se usaron tres ratones desnudos BALB/c para analizar la eliminación de erb_scFv-Col. En resumen, después de una purga previa, se inyectó cada ratón por vía subcutánea (s.c.) con 25 µg (2 mg/kg de peso corporal) de erb_scFv-Col. Durante las siguientes 70 h, se recogieron muestras de sangre periódicas y se evaluó su contenido de erb_scFv-Col mediante ELISA.

La estructura de triple hélice del dominio colagenoso normalmente hace que los colágenos sean resistentes a enzimas proteolíticas no específicas. Se estudió la estabilidad en suero de erb_scFv-Col y se comparó con la de erb_scFv-Fc y erb_scFv mediante la incubación de cada una de las variantes de anticuerpos purificados en suero humano a 37°C durante varios períodos. La inmunorreactividad de los diversos anticuerpos erb se determinó mediante ELISA. Como se muestra en la Fig. 10A, erb_scFv-Col fue más estable que erb_svFv-Fc en suero humano a temperatura fisiológica, reteniendo el 60% de su actividad de unión inicial dentro de las 72 h de incubación. El erb_scFv se degradó rápidamente en suero humano, reteniendo menos del 40% de su actividad de unión inicial en el lapso de 1 h de incubación. Los resultados indicaron que el péptido similar a colágeno de triple hélice de erb_scFv-Col y la región Fc de erb_scFv-Fc son más resistentes que erb_scFv a la digestión con proteasa sérica. Por lo tanto, los anticuerpos triméricos solubles de la invención pueden tener mayor estabilidad en suero que los anticuerpos monoméricos o diméricos.

La Fig. 10B presenta el perfil farmacocinético de erb_scFv-Col en ratones. La cinética del modelo de dos compartimentos se determinó después de una sola administración intravenosa de erb_scFv-Col a razón de 2 mg/kg. El nivel en plasma de inmunorreactividad disminuyó bífasicamente con una semivida de la fase de distribución ($t_{1/2\alpha}$) de 0,21 h y una semivida de fase de eliminación terminal ($t_{1/2\beta}$) de 4,78 h.

Ensayo de proliferación de células T y reacción mixta de linfocitos (MLR)

Se realizó un ensayo de proliferación celular en 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). En resumen, se sembraron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas en una placa de cultivo de fondo plano negro de 96 pozos a razón de 2×10^5 células/pozo en 100 µL de medio RPMI-1640 con 10% de FBS a 37°C en presencia de una dilución en serie de 10 veces de OKT3 (eBioscience, Inc.) o OKT3_scFv-Col durante 66 h. Las células fueron pulsadas con 10 µM de BrdU durante 6 h. Después de eliminar el medio de cultivo, se fijaron las células y el ADN se desnaturalizó en una etapa con FixDenat. Posteriormente, las células se incubaron con un anticuerpo anti-BrdU marcado con peroxidasa (POD anti-BrdU, fragmentos Fab) durante 1,5 h a temperatura ambiente. La detección y cuantificación de la quimioluminiscencia se realizó utilizando un luminómetro de microplacas (plataforma de detección Hidex, CHAMELEON, Finlandia).

La proliferación de células T y la inmunosupresión en la reacción de linfocitos mixtos de una sola vía se evaluaron de la siguiente manera. Se obtuvieron PBMC humanas de dos donantes sanos (estimulador y respondedor). Las células estimuladoras o respondedoras se trataron con 25 µg/mL de mitomicina C (Sigma-Aldrich) en un medio completo (RPMI 1640 complementado con 10% de suero humano AB, glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 nM y 100 unidades/mL cada una de penicilina y estreptomycin) durante 30 minutos en aire humidificado que contiene 5% de CO₂ a 37°C, seguido de tres lavados en medio RPMI 1640. Las células respondedoras se cultivaron solas o se mezclaron con un estimulador tratado con mitomicina C o células respondedoras a mitomicina C en una relación 1:1 a razón de 2×10^5 células/pozo en 200 µL de medio completo. Se añadió OKT3_scFv-Col o OKT3 purificado a diferentes concentraciones a los cultivos inmediatamente después de la siembra de las células respondedoras. Después de 5 días, las células cultivadas se pulsaron con 10 µM de BrdU y se recogieron 24 h después. El ensayo de proliferación celular se realizó entonces de la manera descrita anteriormente.

Para determinar si OKT3_scFv-Col, tras aumentar la avidéz de unión a las células T CD3(+), puede presentar actividad inmunosupresora que sea superior a la de la IgG OKT3 parental, ambos se probaron por la activación mitogénica de células T en una reacción linfocítica mixta de una sola vía (MLR). En cultivos mixtos de PBMC (estimulador + respondedor, tratados con mitomicina C) incubados durante 5 días sin tratamiento con anticuerpos,

se desarrolló una reacción mixta de linfocitos (MLR) como resultado de la estimulación alogénica de la activación de células T (Figura 11B, cuadrado relleno). El tratamiento de cultivos mixtos de PBMC con IgG OKT3 estimula adicionalmente la proliferación de células T (Fig. 11B, círculos rellenos). Por el contrario, OKT3_scFv-Col suprimió MLR de una manera dependiente de la dosis, alcanzando el nivel de fondo a una concentración de 100 ng/mL (Figura 11B, círculos sin relleno). Estos resultados indican que OKT3_scFv-Col es un potente inmunosupresor de la proliferación de células T mientras que muestra una mitogenicidad reducida *in vitro*.

Medición de citoquinas

La actividad mitogénica de OKT3 murino es causada por entrecruzamiento extensivo de CD3 con el receptor de células T (TCR) a través de la unión a células positivas para FcR. Por lo tanto, recientemente se han realizado esfuerzos para desarrollar formas no mitogénicas de anti-CD3 alterando la unión al receptor de Fc. Como modelo de la molécula de CSA, se generó OKT3_scFv-Col para comprobar si es no mitogénico mediante la sustitución de la región Fc de IgG OKT3 por un péptido de tipo colágeno. Las PBMC humanas se sembraron en placa a razón de 2×10^5 células/pozo en 0,1 mL de medio RPMI-1640 con 10% de FBS a 37°C en presencia de una dilución en serie de 10 veces de OKT3 o OKT3_scFvCol. Los sobrenadantes se recogieron en diferentes momentos y se midieron múltiples citoquinas usando un kit de inmunoensayo de citoquina humana (eBioscience, Inc.).

Se midieron las capacidades de IgG OKT3 y OKT3_scFv-Col para inducir la proliferación de células T y liberar citoquinas inflamatorias y de otro tipo (IL-2, IFN- γ y TNF- α). Como se esperaba, la IgG OKT3 indujo la proliferación de células T y la producción de citoquinas a una dosis muy baja, mientras que se indujo proliferación no detectable de células T o producción de citoquina por OKT3_scFv-Col, incluso a altas concentraciones (Fig. 11A y Fig. 12). Por lo tanto, estos resultados demuestran que, a diferencia de IgG OKT3, OKT3_scFv-Col no presenta propiedades de activación de células T. Los resultados indicaron que la administración de OKT3_scFv-Col provoca una liberación insignificante de citoquinas en comparación con IgG OKT3 de murino.

Estos resultados demuestran que OKT3_scFv-Col es más eficaz en la inmunosupresión de la proliferación de células T mientras que exhibe una actividad mitogénica insignificante en la estimulación de la proliferación de células T. Por lo tanto, los anticuerpos triméricos solubles de la invención pueden tener una mitogenicidad reducida. Como resultado, el anticuerpo de armazón de colágeno puede ser una estructura ideal para el diseño de anticuerpos terapéuticos tanto en aplicaciones antitumorales como inmunomoduladoras.

Ejemplo 11

Unión de un dominio heterólogo al dominio del armazón del extremo terminal C

Un trabajo anterior informó que un triplex de (Gly-Pro-Pro)₁₀ unido a disulfuro intercatenario se puede obtener *in vitro* mediante un proceso de redistribución redox de un nudo de disulfuro de colágeno tipo III, ya sea en el extremo terminal C o N adyacente al péptido tipo colágeno a 20°C (Frank y col., (2003) J Biol Chem 278: 7747-7750). Para investigar si el (Gly-Pro-Pro)₁₀ puede dirigir la trimerización de un compañero de fusión del extremo terminal C *in vivo*, se generó una molécula de CSA, Col-erb_scFv, compuesta por un gen de armazón de colágeno sintético del extremo terminal N que codifica una secuencia peptídica de TCPPCPRSIP(GPP)₁₀GICDPSLC, y un erb_scFv en el extremo terminal C (Fig. 13A). Los resultados mostraron que el Col-erb_scFv purificado presenta una característica de estructura similar a la observada en erb_scFv-Col, excepto que la cantidad de hexámero en Col-erb_scFv es menor que la de erb_scFv-Col (Figura 13B). Por lo tanto, el armazón del péptido (Gly-Pro-Pro)₁₀ por sí mismo puede impulsar la trimerización de un compañero de fusión en el extremo terminal C de scFv.

Ejemplo 12

Requisitos para dirigir la trimerización de CSA

Se generó una molécula de CSA, erb_scFv-GPP₁₀, para demostrar que el péptido similar al colágeno, que comprende (GPP)₁₀, por sí mismo puede impulsar la formación de una proteína de fusión trimérica no covalentemente unida, sin la ayuda de ningún otro los dominios de trimerización o los residuos de aminoácidos de entrecruzamiento intercatenario (tales como Cys y Lys) presentes dentro o que flanquean el dominio de tipo colágeno. La región de codificación de erb_scFv-GPP₁₀ incluía una secuencia de nucleótidos del extremo terminal N de erb_scFv y un gen de armazón de colágeno sintético del extremo terminal C que codifica una secuencia peptídica de GSP(GPP)₁₀GPSSGG (Fig. 14A). Como se muestra en la Fig. 14B, erb_scFv-GPP₁₀ forma un trímero térmicamente estable solamente, con una temperatura de fusión similar a la de la estructura unida a disulfuro intercatenario reducida/alquilada de erb_scFv-Col (Fig. 6A). Mientras tanto, erb_scFv-GPP₁₀ conserva una fuerte avidez de unión hacia EGFR-ECD, lo que indica que el erb_scFv está plegado correctamente (Fig. 14C).

Ejemplo 13

Producción de moléculas de CSA con diferentes péptidos similares al colágeno como dominios de armazón

El scFv derivado de Vectibix (panitumumab; Amgen, Thousand Oaks, CA, EE.UU.), un mAb terapéutico anti-EGFR completamente humano se usó para construir dos tipos diferentes de CSA: 763_scFv-Col y 763CSA2 con diferentes péptidos tipo colágeno, (GPP)₁₀ (Figura 15A) y (GPP)₅GKPGKP(GPP)₆ (Figura 16A)), respectivamente, como dominios de armazón. Ambos CSA se ensamblaron en trímeros como se analizó mediante SDS-PAGE (Fig. 15B y 16B). El 763_scFv-Col efectivamente bloqueó la señalización de EGFR a una concentración equivalente al panitumumab parental (Fig. 15C). Mientras tanto, 763CSA2 retiene una fuerte avidéz de unión hacia EGFR (purificado de la línea celular de carcinoma epitelial humano A431), lo que indica que erb_scFv se pliega correctamente (Fig. 16C).

Ejemplo 14

Producción de una molécula de CSA biespecífica

Se generó una molécula de CSA biespecífica, 763CSAOKT3, para demostrar que el armazón de colágeno de autotrimerización es más versátil ya que permite la unión de los compañeros de fusión a ambos extremos terminales simultáneamente (Figura 17A). Los medios de cultivo que contienen 763CSAOKT3 secretor de cuatro clones estables diferentes se examinaron por análisis de transferencia Western. Las moléculas 763CSAOKT3 se ensamblaron en una estructura trimérica y se pueden oligomerizar adicionalmente en un hexámero, presumiblemente a través del entrecruzamiento de disulfuro intercatenario entre los dos residuos de cisteína del extremo terminal C dentro de los dos trímeros (Fig. 17B). Después de la purificación, la forma principal de 763CSAOKT3 está presente como un trímero en condiciones no reductoras (Fig. 17C, carril 1).

El resultado anterior tiene consecuencias importantes ya que el armazón de colágeno de autotrimerización puede desplegarse para construir moléculas que pueden interactuar (cada extremo con una valencia de unión de hasta 3 o 6) simultáneamente con dos compañeros de unión voluminosos. Como se muestra en la Fig. 18, el 763CSAOKT3 biespecífico puede entrecruzar células T A431 (positivas para EGFR) y CD3(+) humanas. Por consiguiente, 763CSAOKT3 puede servir como un agente de acoplamiento de células T capaz de redirigir la citotoxicidad de células T frente a diversas células cancerosas que expresan EGFR.

Ejemplo 15

Producción de una molécula bifuncional de CSA

Se generó una molécula de CSA bifuncional, h4D5CSA-Luc, como se representa en la Fig. 19A. Los medios de cultivo que contienen h4D5CSA-Luc secretora se purificaron mediante cromatografías. Las moléculas de h4D5CSA-Luc se ensamblaron en una estructura trimérica y se pueden oligomerizar adicionalmente en un hexámero, presumiblemente a través del entrecruzamiento de disulfuro intercatenario entre los dos residuos de cisteína del extremo terminal C dentro de los dos trímeros (Fig. 19B). Se realizó un ELISA de bioluminiscencia para demostrar que h4D5CSA-Luc conservaba las actividades tanto de unión a HER2/neu como de bioluminiscencia. Como se muestra en la Fig. 19C, h4D5CSA-Luc purificada capturada en pozos recubiertos con células de carcinoma SKOV-3 de ovario humano que sobreexpresan HER2/neu retienen la capacidad de catalizar coelenterazina y emitir luz de una forma dependiente de la concentración.

El resultado anterior tiene importantes consecuencias ya que el armazón de colágeno de autotrimerización puede desplegarse para construir moléculas que pueden interactuar (cada extremo con una valencia de unión de hasta 3 o 6) con un compañero de unión y la interacción puede detectarse directamente incubando el dominio de luciferasa del extremo terminal C de la molécula de CSA bifuncional con sustrato bioluminiscente. Presumiblemente, h4D5CSA-Luc puede servir como reactivo para diagnóstico molecular o formación de imágenes ópticas.

Ejemplo 16

Producción de un CSA anti-TNF- α

Se usó el scFv derivado de la línea celular de hibridoma 357-101-4 (ECACC No. 92030603), un mAb anti-TNF- α humano de ratón con fuertes actividades neutralizantes para construir una molécula de CSA, 357scFv-Col. El 357_scFv-Col purificado presenta una característica estructural similar a la observada en el formato de scFv-Col (Figura 20A). Se comparó el grado de neutralización de la apoptosis inducida por TNF- α de células L929 por 357_scFv-Col e IgG 357. Como se muestra en la Fig. 20B, la 357_scFv-Col exhibe una actividad neutralizante aproximadamente 4 veces más fuerte que la IgG 357 bivalente.

Todas las características descritas en esta memoria descriptiva se pueden combinar en cualquier combinación. Cada característica divulgada en esta memoria descriptiva puede ser reemplazada por una característica alternativa

que tenga el mismo propósito, equivalente o similar. Por lo tanto, a menos que se indique expresamente lo contrario, cada característica divulgada es solo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

Referencias

- 5 Bachinger, H. P., Bruckner, P., Timpl, R., Prockop, D. J., y Engel, J. (1980). Folding mechanism of the triple helix in type-III collagen and type-III pN-collagen. Role of disulfide bridges and peptide bond isomerization. *Eur J Biochem* 106, 619-632.
- 10 Berg, R. A., y Prockop, D. J. (1973). The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 52, 115-120.
- 15 Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M. G., y Pluckthun, A. (2004). High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol* 22, 575-582.
- 20 Binz, H. K., Amstutz, P., y Pluckthun, A. (2005). Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol* 23, 1257-1268.
- 25 Boudko, S., Frank, S., Kammerer, R. A., Stetefeld, J., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Bachinger, H. P., y Engel, J. (2002). Nucleation and propagation of the collagen triple helix in single-chain and trimerized peptides: transition from third to first order kinetics. *J Mol Biol* 317, 459-470.
- 30 Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E., y Shepard, H. M. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4285-4289.
- 35 Chopra, R. K., y Ananthanarayanan, V S. (1982). Conformational implications of enzymatic proline hydroxylation in collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 7180-7184.
- 40 Chou, M. Y., y Li, H. C. (2002). Genomic organization and characterization of the human type XXI collagen (COL21A1) gene. *Genomics* 79, 395-401.
- 45 Dubel, S., Breitling, F., Kontermann, R., Schmidt, T., Skerra, A., y Little, M. (1995). Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single-chain antibodies (scFv). *J Immunol Methods* 178, 201-209.
- 50 Engel, J., Chen, H. T., Prockop, D. J., y Klump, H. (1977). The triple helix in equilibrium with coil conversion of collagen-like polytripeptides in aqueous and nonaqueous solvents. Comparison of the thermodynamic parameters and the binding of water to (L-Pro-L-Pro-Gly)_n and (L-Pro-L-Hyp-Gly)_n. *Biopolymers* 16, 601-622.
- 55 Fietzek, P. P., y Kuhn, K. (1976). The primary structure of collagen. *Int Rev Connect Tissue Res* 7, 1-60.
- 60 Frank, S., Boudko, S., Mizuno, K., Schulthess, T., Engel, J., y Bachinger, H. P. (2003). Collagen triple helix formation can be nucleated at either end. *J Biol Chem* 278, 7747-7750.
- 65 Frank, S., Kammerer, R. A., Mechling, D., Schulthess, T., Landwehr, R., Bann, J., Guo, Y., Lustig, A., Bachinger, H. P., y Engel, J. (2001). Stabilization of short collagen-like triple helices by protein engineering. *J Mol Biol* 308, 1081-1089.
- Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sigurskjold, B. W., Lorentsen, R. H., Moestrup, S. K., Thogersen, H. C., y Etzerodt, M. (2000). Mutational analysis of affinity and selectivity of kringle-tetranectin interaction. Grafting novel kringle affinity onto the tetranectin lectin scaffold. *J Biol Chem* 275, 37390-37396.
- Hakansson, K., Lim, N. K., Hoppe, H. J., y Reid, K. B. (1999). Crystal structure of the trimeric alpha-helical coiled-coil and the three lectin domains of human lung surfactant protein D. *Structure* 7, 255-264.
- Hakansson, K., y Reid, K. B. (2000). Collectin structure: a review. *Protein Sci* 9, 1607-1617.
- Harbury, P. B., Zhang, T., Kim, P. S., y Alber, T. (1993). A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* 262, 1401-1407.
- Holler, N., Tardivel, A., Kovacsics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., y col. (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol* 23, 1428-1440.
- Holliger, P., y Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23, 1126-1136.

- Hoppe, H. J., Barlow, P. N., y Reid, K. B. (1994). A parallel three stranded alpha-helical bundle at the nucleation site of collagen triple-helix formation. *FEBS Lett* 344, 191-195.
- 5 Ito, W., y Kurosawa, Y. (1993). Development of an artificial antibody system with multiple valency using an Fv fragment fused to a fragment of protein A. *J Biol Chem* 268, 20668-20675.
- Kivirikko, K. I., Myllyla, R., y Pihlajaniemi, T. (1992). Hydroxylation of proline and lysine residues in collagens and other animal and plant proteins. In *Post-Translational Modifications of Proteins* (Harding, J. J., and Crabbe, M. J. C., Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL., 1-51.
- 10 Li, H. C., Huang, C. C., Chen, S. F., y Chou, M. Y (2005). Assembly of homotrimeric type XXI minicolágeno by coexpression of prolyl 4-hydroxylase in stably transfected *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 375-385.
- 15 Lynn, A. K., Yannas, I. V., y Bonfield, W. (2004). Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 71, 343-354.
- Mazzorana, M., Cogne, S., Goldschmidt, D., y Aubert-Foucher, E. (2001). Collagenous sequence governs the trimeric assembly of collagen XII. *J Biol Chem* 276, 27989-27998.
- 20 Mohs, A., Silva, T., Yoshida, T., Amin, R., Lukomski, S., Inouye, M., y Brodsky, B. (2007). Mechanism of stabilization of a bacterial collagen triple helix in the absence of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.* 282, 29757-29765.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M., y Nygren, P.A. (1997). Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat Biotechnol* 15, 772-777.
- 25 Persikov, A. V., Xu, Y., y Brodsky, B. (2004). Equilibrium thermal transitions of collagen model peptides. *Protein Sci.* 13: 893-902.
- 30 Persikov, A. V., Ramshaw, J. A. M., Kirkpatrick, A., y Brodsky, B. (2000). Amino acid propensities for the collagen triple-helix. *Biochemistry* 39, 14960-14967.
- Prockop, D. J., y Kivirikko, K.I. (1995). Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64, 403-434.
- 35 Queen, C., Schneider, W.P., Selick, H. E., Payne, P. W., Landolfi, N. F., Duncan, J. F., Avdalovic, N. M., Levitt, M., Junghans, R. P., y Waldmann, T. A. (1989). A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033.
- 40 Rheinhecker, M., Hardt, C., Ilag, L. L., Kufer, P., Gruber, R., Hoess, A., Lupas, A., Rottenberger, C., Pluckthun, A., y Pack, P. (1996). Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. *J Immunol* 157, 2989-2997.
- 45 Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H., y Winter, G. (1988). Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323-327.
- Rosenbloom, J., Harsch, M., y Jimenez, S. (1973). Hydroxyproline content determines the denaturation temperature of chick tendon collagen. *Arch Biochem Biophys* 158, 478-484.
- 50 Sakakibara, S., Inouye, K., Shudo, K., Kishida, Y., Kobayashi, Y., y Prockop, D. J. (1973). Synthesis of (Pro-Hyp-Gly)_n of defined molecular weights. Evidence for the stabilization of collagen triple helix by hydroxyproline. *Biochim Biophys Acta* 303, 198-202.
- Shaw, L. M., y Olsen, B. R. (1991). FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem Sci* 16, 191-194.
- 55 Sheriff, S., Chang, C. Y, y Ezekowitz, R. A. (1994). Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. *Nat Struct Biol* 1:789-794.
- 60 Skerra, A. (2000). Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta* 1482, 337-350.
- Weis, W. I., y Drickamer, K. (1994). Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure* 2, 1227-1240.
- 65 Yang, W., Chan, V. C., Kirkpatrick, A., Ramshaw, J. A., y Brodsky, B. (1997). Gly-Pro-Arg confers stability similar to Gly-Pro-Hyp in the collagen triple-helix of host-guest peptides. *J Biol Chem* 272, 28837-28840.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo soluble trimérico que comprende tres polipéptidos, en el que cada polipéptido comprende:

- 5 (a) la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG (SEQ ID NO: 13); y
(b) un dominio de unión a antígeno,

en el que cada polipéptido no contiene ningún otro dominio de trimerización o entrecruzamiento de disulfuro intercatenario dentro o que flanquea la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG.

10 2. El anticuerpo soluble trimérico de la reivindicación 1, en el que el ligando para el anticuerpo soluble trimérico es el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano.

15 3. El anticuerpo soluble trimérico de la reivindicación 1, en el que el ligando para el anticuerpo soluble trimérico es CD3 humano.

4. El anticuerpo soluble trimérico de la reivindicación 1, en el que el ligando para el anticuerpo soluble trimérico es TNF- α humano.

20 5. El anticuerpo soluble trimérico de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a CD3 humano.

25 6. El anticuerpo soluble trimérico de la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende además una secuencia codificante para un polipéptido marcador.

7. El anticuerpo soluble trimérico de la reivindicación 6, en el que el polipéptido marcador es un polipéptido de luciferasa o un polipéptido fluorescente verde.

30 8. El anticuerpo soluble trimérico de la reivindicación 1, en el que cada polipéptido comprende dos dominios de unión a antígeno.

9. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo soluble trimérico de la reivindicación 1.

35 10. Un vector de expresión que expresa el anticuerpo soluble trimérico de la reivindicación 1 cuando se introduce en una célula huésped.

11. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 10.

40 12. Un método *in vitro* para generar un anticuerpo soluble trimérico que comprende:

(a) unir un ácido nucleico que codifica la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG (SEQ ID NO: 13) en marco con un ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno para un ligando; y

45 (b) expresar el polipéptido codificado en una célula que hidroxiprolina al menos 6 de las repeticiones de GPP en el segundo de los dos residuos P, en donde la célula es una célula eucariótica que contiene una actividad enzimática que hidroxila un residuo de prolina,

en el que el polipéptido no contiene ningún otro dominio de trimerización o entrecruzamiento de disulfuro intercatenario dentro o que flanquea la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG.

50 13. El método de la reivindicación 12, en el que el ligando para el anticuerpo soluble trimérico es el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, CD3 humano o TNF- α humano.

14. Un método *in vitro* para modular la actividad biológica de un ligando que comprende incubarlo con un anticuerpo soluble trimérico que comprende tres polipéptidos con el ligando;
55 en el que cada polipéptido comprende:

- (a) la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG (SEQ ID NO: 13); y
(b) un dominio de unión a antígeno,

60 en el que cada polipéptido no contiene ningún otro dominio de trimerización o entrecruzamiento de disulfuro intercatenario dentro o que flanquea la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG;
en el que la unión del anticuerpo soluble trimérico al ligando modula la actividad biológica del ligando.

65 15. El método de la reivindicación 14, en el que el ligando para el anticuerpo soluble trimérico es el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, CD3 humano o TNF- α humano.

16. Un método *in vitro* para detectar un ligando que comprende

(1) incubar un anticuerpo soluble trimérico que comprende tres polipéptidos con el ligando;
en el que cada polipéptido comprende:

5

- (a) la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG (SEQ ID NO: 13); y
- (b) un dominio de unión a antígeno,

en el que cada polipéptido no contiene ningún otro dominio de trimerización o entrecruzamiento de disulfuro intercatenario dentro o que flanquea la secuencia GSP(GPP)₁₀GPSSGG; y

10

(2) detectar la unión del anticuerpo soluble trimérico al ligando.

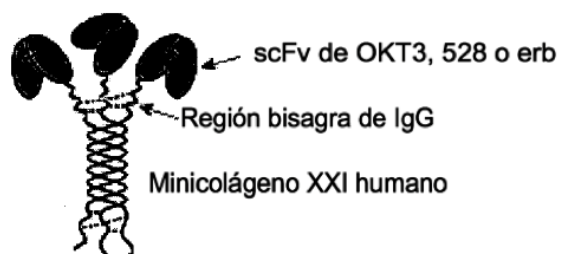
17. El método de la reivindicación 16, en el que cada uno de los tres polipéptidos comprende un polipéptido de luciferasa o un polipéptido fluorescente verde.

15



Fig. 1

A



Anticuerpo de armazón de colágeno

B

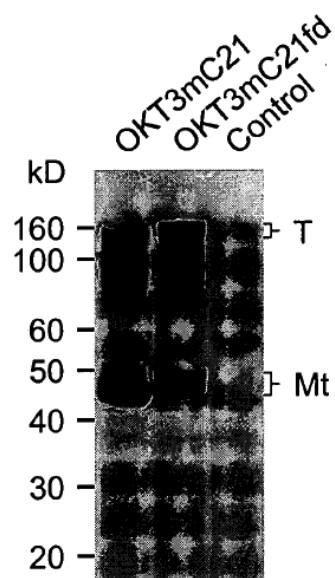


Fig. 2

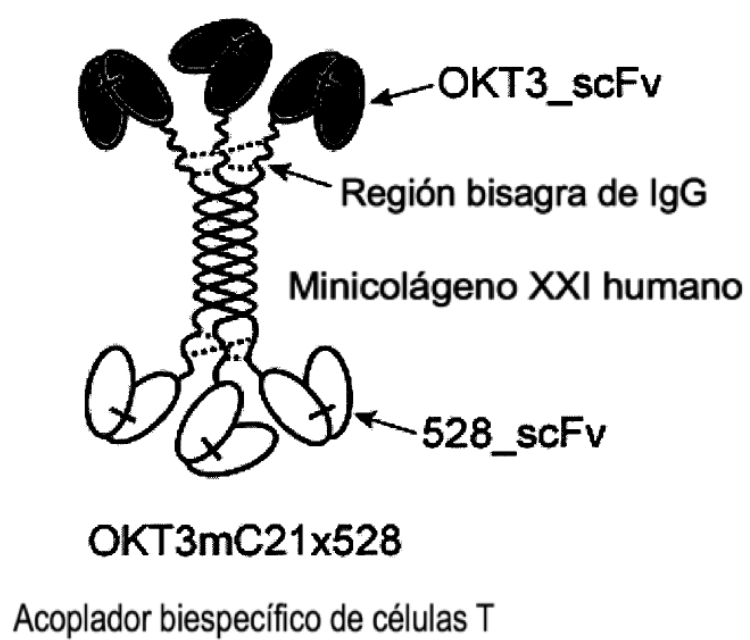
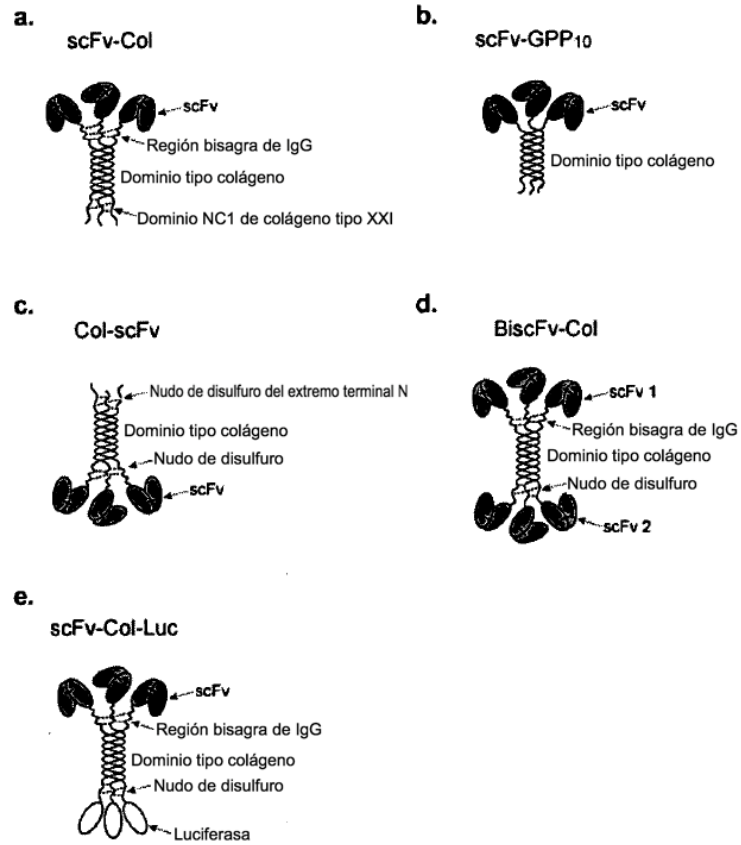


Fig. 3

A



B

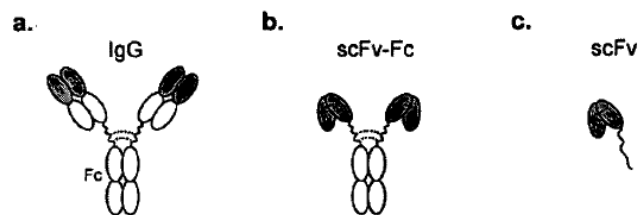


Fig. 4

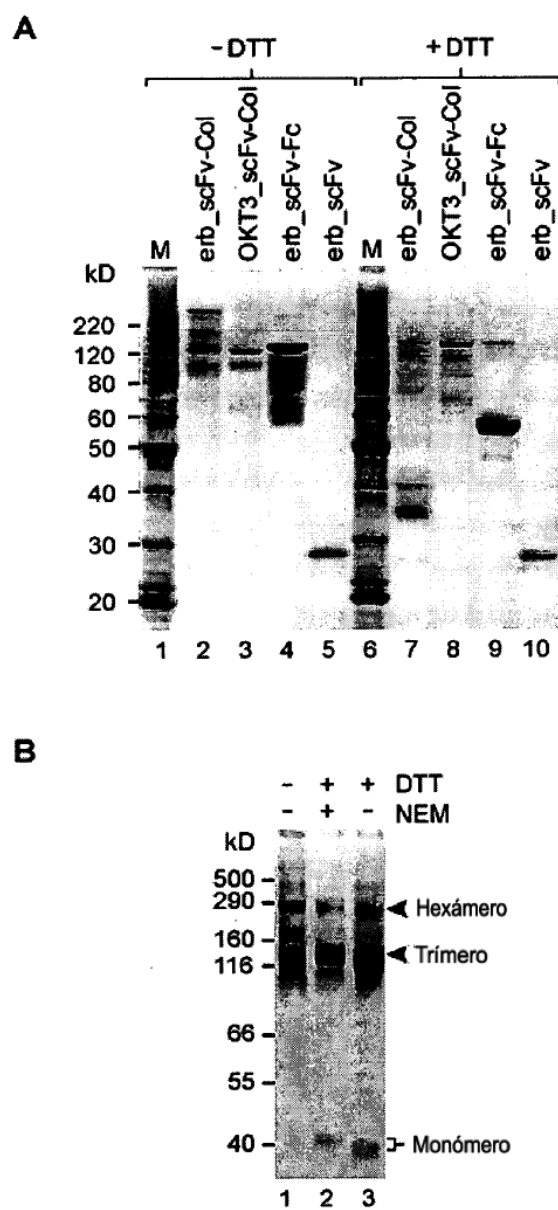
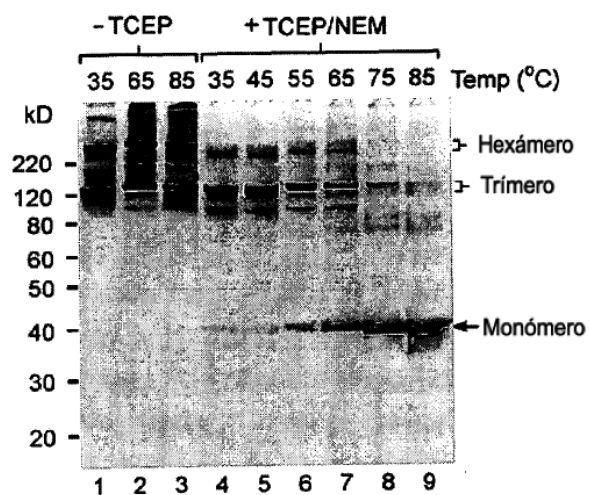


Fig. 5

A



B

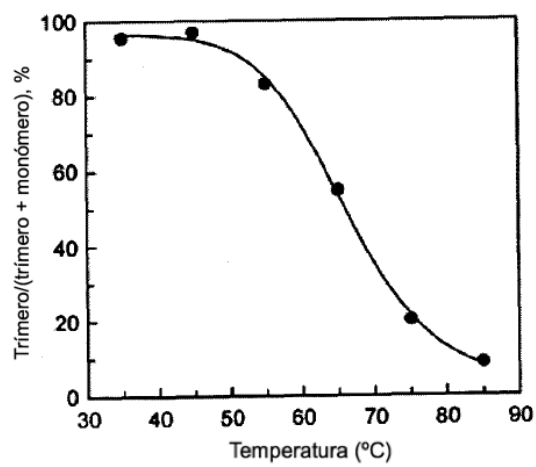


Fig. 6

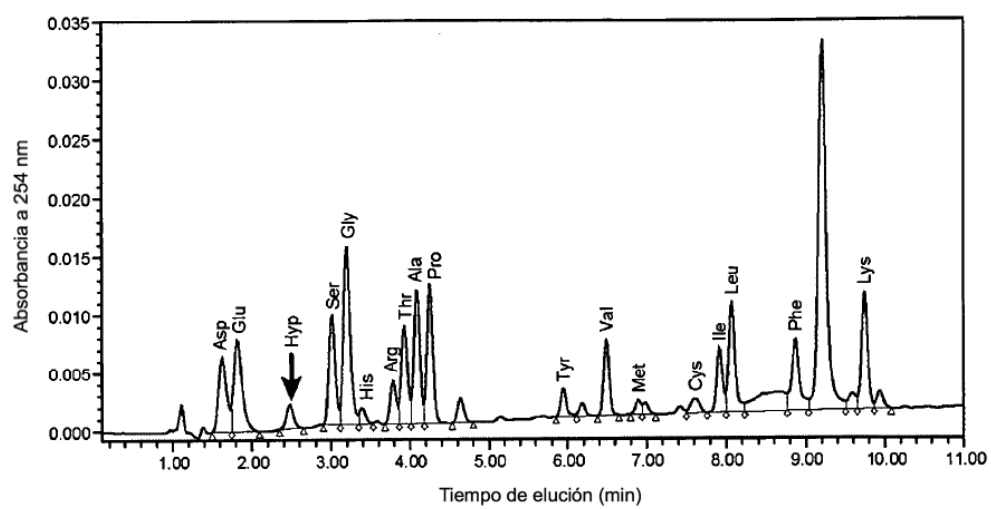


Fig. 7

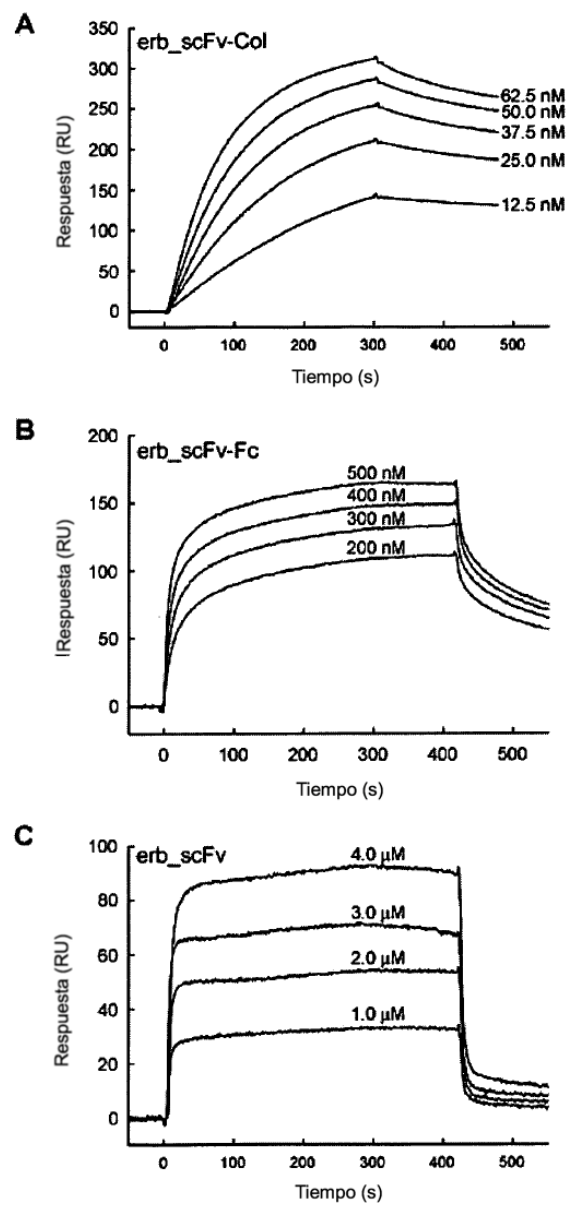


Fig. 8

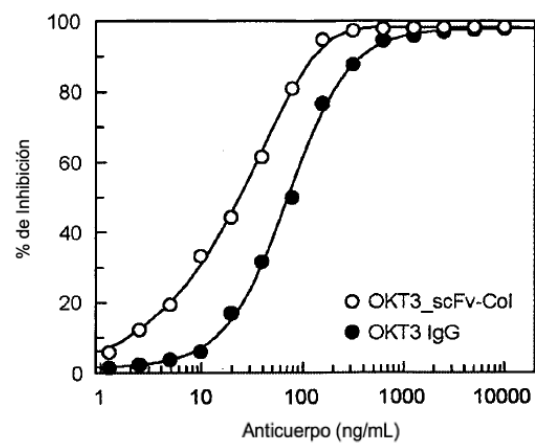
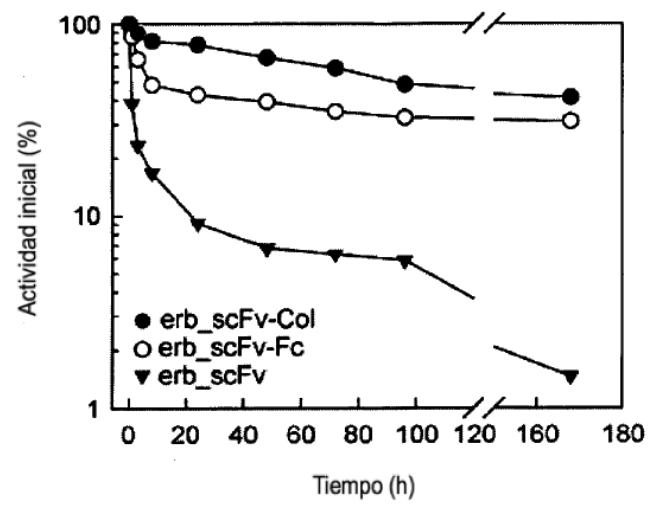


Fig. 9

A



B

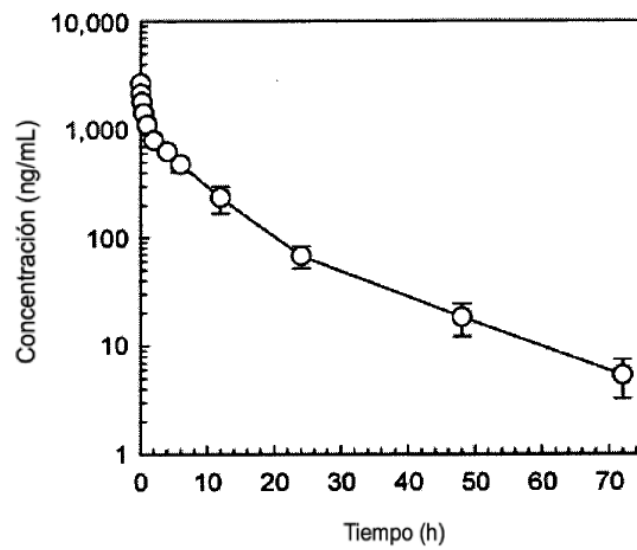


Fig. 10

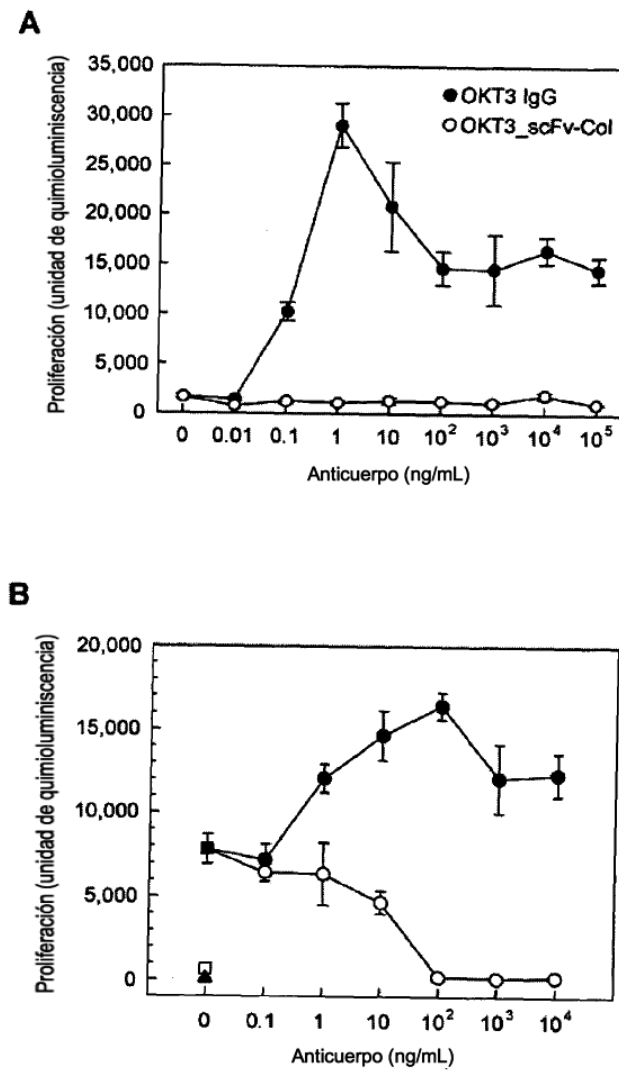


Fig. 11

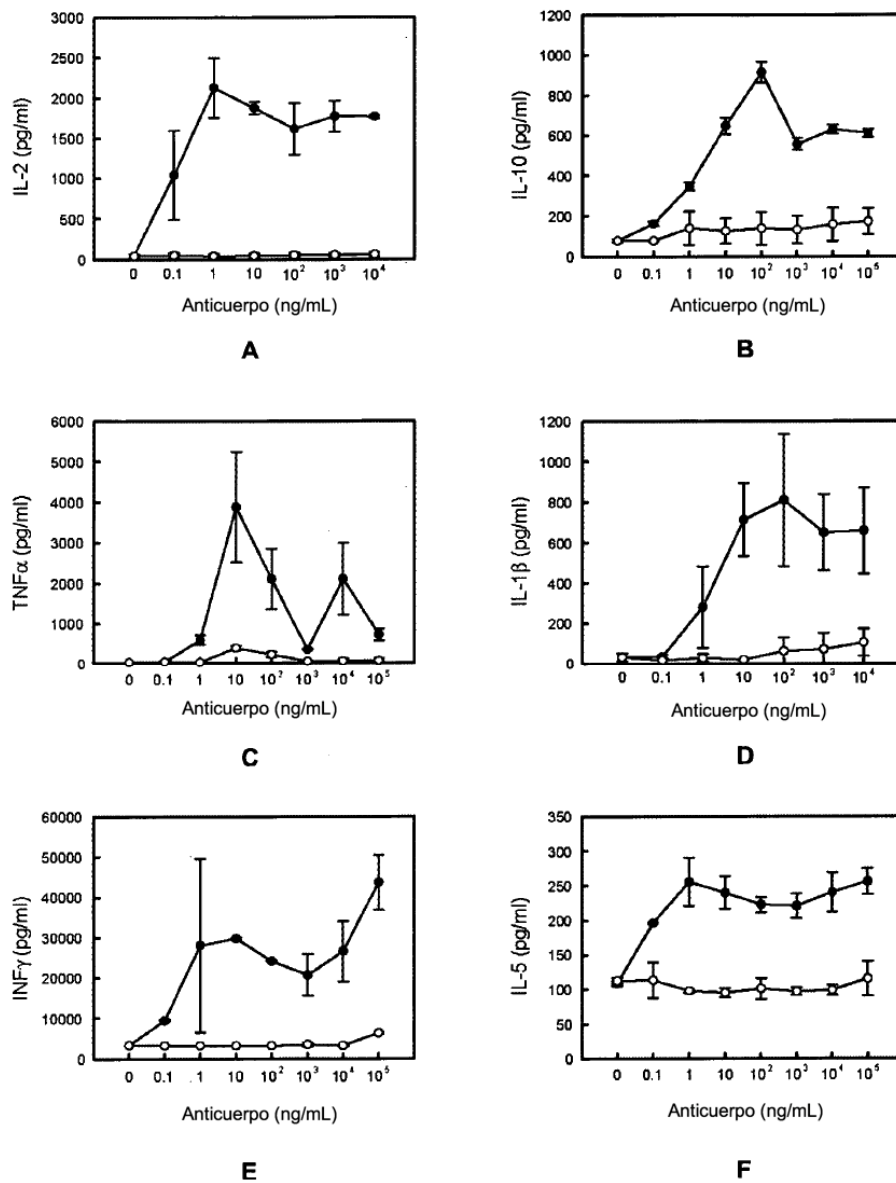
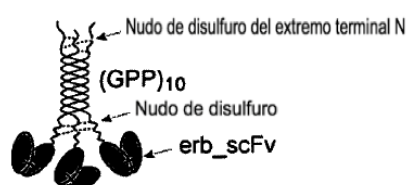


Fig. 12

A



B

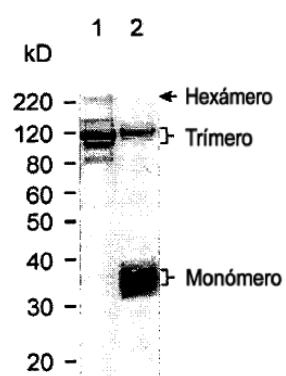
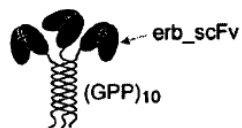
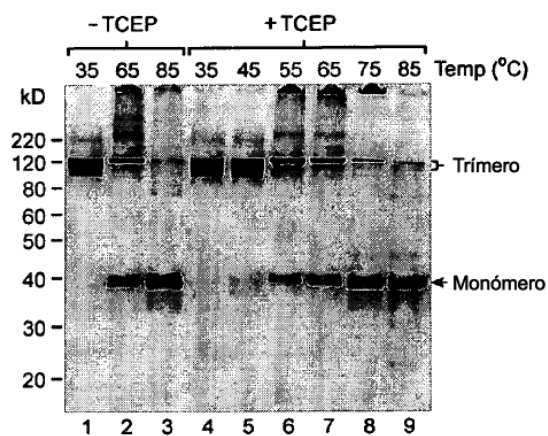


Fig. 13

A



B



C

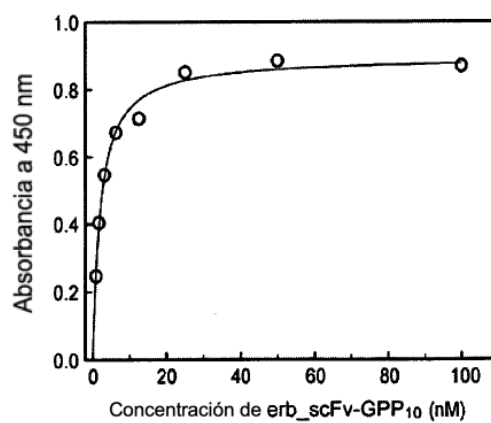


Fig. 14

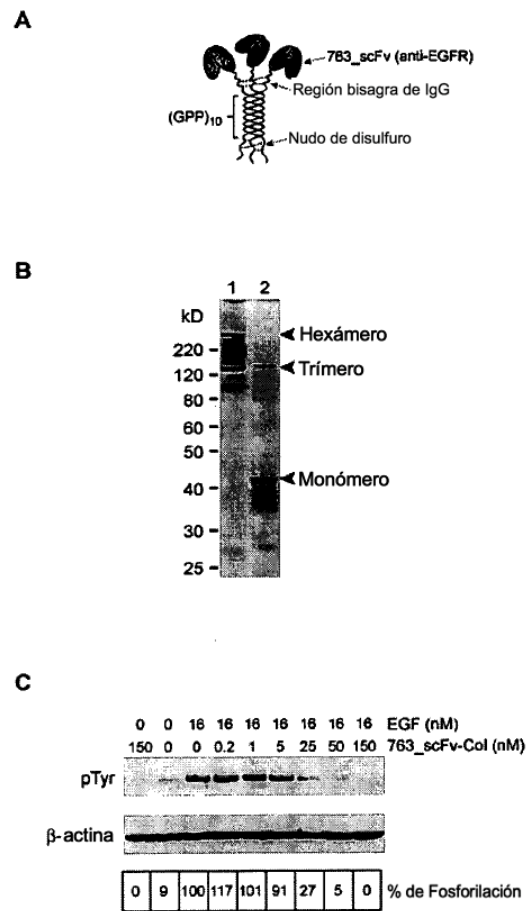


Fig. 15

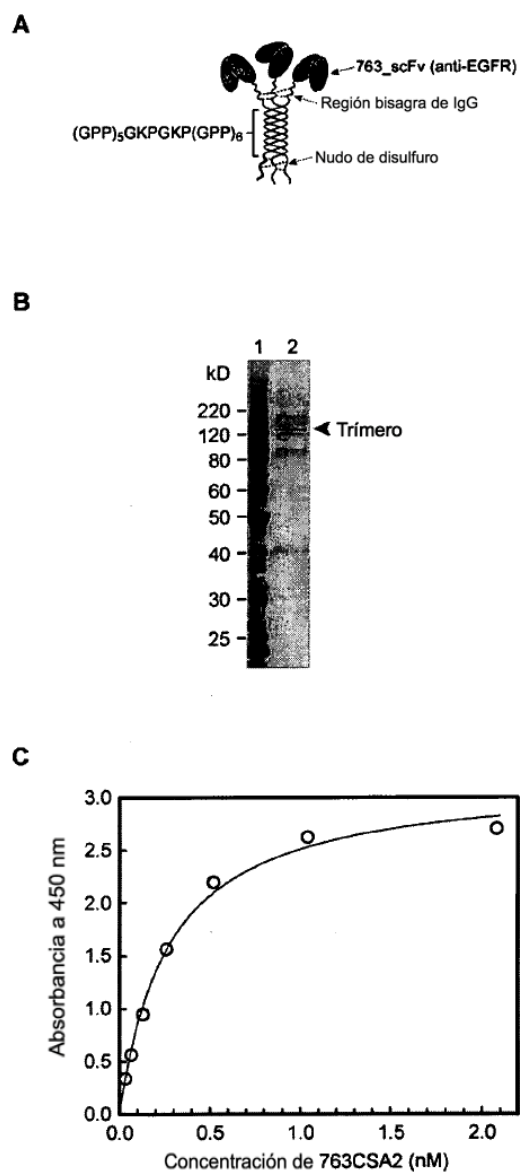
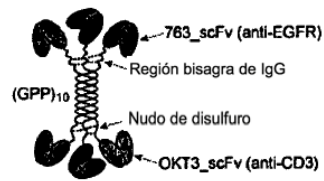
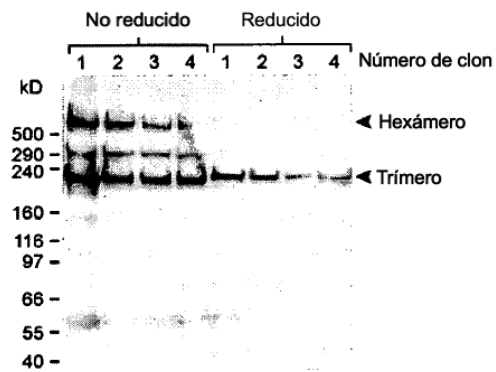


Fig. 16

A



B



C

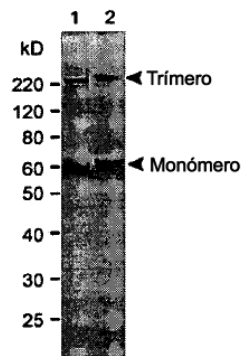


Fig. 17

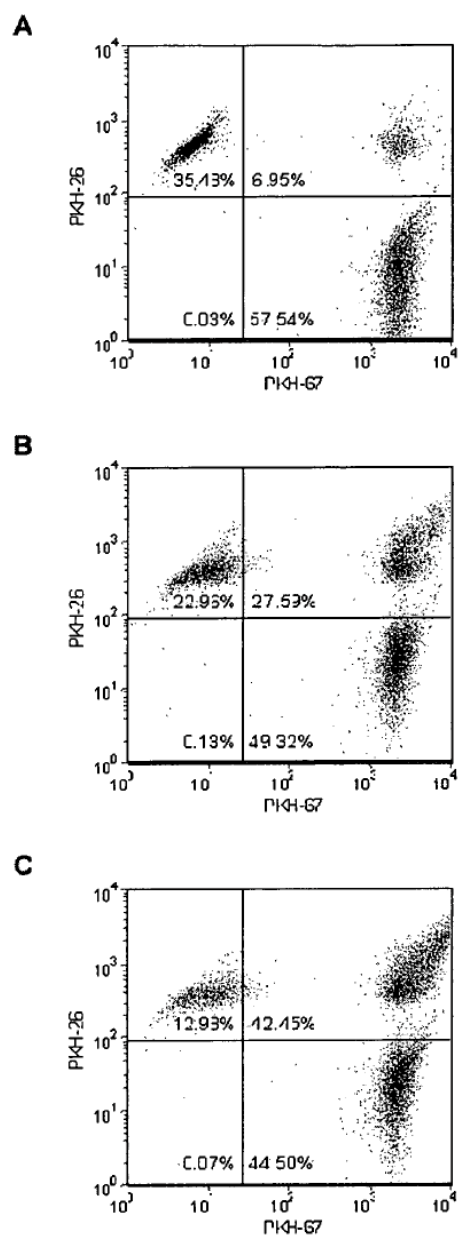
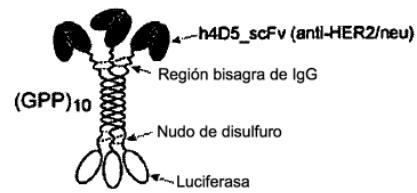
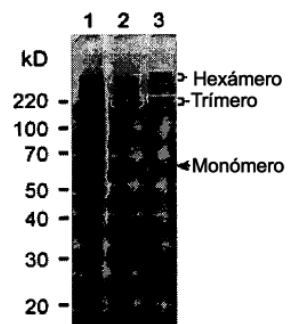


Fig. 18

A



B



C

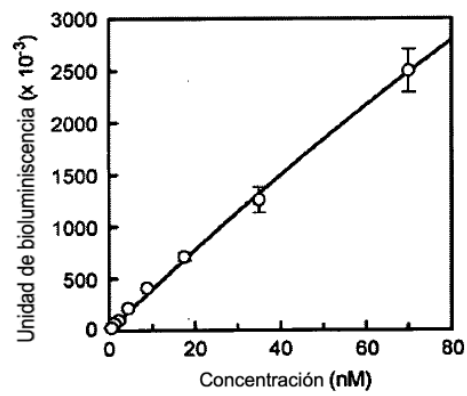
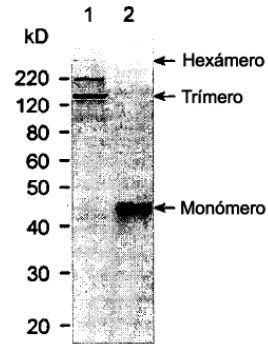


Fig. 19

A



B

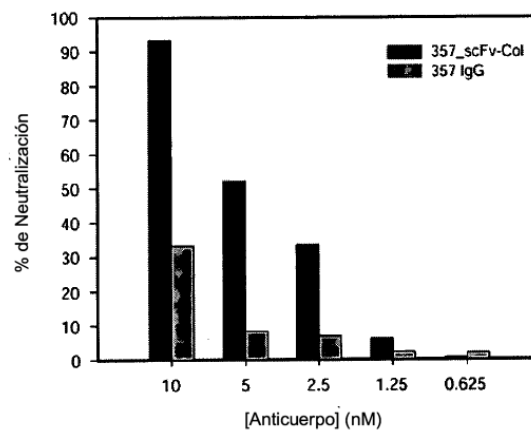


Fig. 20